

Etablierung und Evaluierung serologischer Teste zur Detektion hochpathogener Arboviren

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
aus dem Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie



aus dem Robert Koch-Institut
vorgelegt von

Nadine Litzba
aus Mülheim an der Ruhr

Berlin, 2011

Die Dissertation wurde vom 01.Januar 2007 – 30.September 2010 am Robert Koch-Institut unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias Niedrig durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Niedrig
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am: 11.März 2011

“Once you become informed, you start seeing complexities and shades of gray.
You realize that nothing is as clear and simple as it first appears.”

von Bill Watterson aus „Calvin & Hobbes“

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Ausbreitung von Arboviren	13
1.2	Diagnostik von Viren	15
1.3	Chikungunya-Virus.....	19
1.4	Japanisches Encephalitis-Virus.....	21
1.5	Dengue-Virus	23
1.6	Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus.....	26
1.7	Rifttalfieber-Virus	28
1.8	Sandfliegen-Fieber-Viren	29
1.9	Zielsetzung	32
2	Material und Methoden	33
2.1	Material.....	33
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	33
2.1.1.1	Geräte.....	33
2.1.1.2	Verbrauchsmaterialien	34
2.1.2	Chemikalien, Medien, Puffer und Gebrauchslösungen	35
2.1.2.1	Chemikalien.....	35
2.1.2.2	Medien	36
2.1.2.3	Puffer und Gebrauchslösungen.....	36
2.1.3	Enzyme und Kits	38
2.1.3.1	Enzyme	38
2.1.3.2	Kits	38
2.1.4	Nukleinsäure- und Proteinstandards, Primer und Plasmide	39
2.1.4.1	Nukleinsäure- und Proteinstandards	39
2.1.4.2	Primer	39
2.1.4.3	Vektoren und Vektor-Gen-Konstrukte	40
2.1.4.4	Vektor-Gen-Konstrukte.....	41
2.1.5	Antikörper	42
2.1.6	Zelllinien, Viren, Bakterien	42
2.1.6.1	Zelllinien	42
2.1.6.2	Viren	42
2.1.6.3	Bakterien	43
2.1.7	Software	43
2.1.8	Humane Probenkollektive zur IIFT-Evaluierung	43
2.1.8.1	Probenkollektive für die anti-CHIKV IIFT-Evaluierung.....	43
2.1.8.2	Probenkollektive für die anti-JEV IIFT-Evaluierung	44

2.1.8.3	Probenkollektiv für die anti-DENV Mosaik IIFT-Austestung	45
2.1.8.4	Probenkollektive für die anti-SFV Mosaik IIFT-Evaluierung	45
2.1.8.5	Probenkollektive für die anti-RVFB IIFT-Evaluierung	45
2.1.8.6	Probenkollektive für die anti-CCHFV IIFT-Evaluierung	45
2.2	Methoden.....	46
2.2.1	Zellkultur und Virusanzucht.....	46
2.2.1.1	Allgemeine Zellkultur	46
2.2.1.2	Viruskultivierung	47
2.2.1.3	Immunfluoreszenz zur Kontrolle der Infektionsrate	47
2.2.1.4	Herstellung der Deckgläser für die EUROIMMUN Immunfluoreszenztest	48
2.2.2	Immunodetektionsassays.....	48
2.2.2.1	EUROIMMUN Immunfluoreszenztest	48
2.2.2.2	Bestimmung von Antikörpern gegen das Chikungunya-Virus	49
2.2.2.2.1	EUROIMMUN anti-CHIKV IIFT	49
2.2.2.2.2	<i>In-house</i> anti-CHIKV IgM- <i>capture</i> und IgG-ELISA.....	50
2.2.2.2.3	<i>In-house</i> anti-CHIKV IIFT	51
2.2.2.3	Bestimmung von Antikörpern gegen das Japanische Enzephalitis- Virus.....	51
2.2.2.3.1	EUROIMMUN anti-JEV IIFT	51
2.2.2.3.2	Flavivirus Profil 2	52
2.2.2.3.3	IgM-Bestimmung mittels des Panbio Japanese Encephalitis-Dengue IgM Combo ELISA	52
2.2.2.3.4	IgM-Bestimmung mittels des InBios JE Detect™ IgM- <i>capture</i> ELISA.....	53
2.2.2.3.5	IgG-Bestimmung mittels des InBios JE Detect™ IgG-ELISA.....	53
2.2.2.3.6	Bestimmung von Antikörpern gegen das Japanische Enzephalitis- Virus mittels PRNT50.....	53
2.2.2.4	Bestimmung von Antikörpern gegen Dengue-Viren	54
2.2.2.4.1	EUROIMMUN anti-DENV IIFT.....	54
2.2.2.4.2	EUROIMMUN anti-DENV NS1 Mosaik IIFT.....	54
2.2.2.4.3	Omega Diagnostics Pathozyme Dengue G zur IgG-Aviditäts- bestimmung.....	54
2.2.2.5	Bestimmung von Antikörpern gegen Sandfliegen-Fieber-Viren.....	55
2.2.2.5.1	EUROIMMUN anti-SFV IIFT	55
2.2.2.5.2	DIESSE Enzywell Toscanavirus ELISA.....	55
2.2.2.5.3	Mikrogen recomLine Bunyavirus IgG/IgM	56
2.2.2.6	Bestimmung von Antikörpern gegen das Riftalfieber-Virus.....	56

2.2.2.6.1	EUROIMMUN anti-RVFB IIFT	56
2.2.2.6.2	anti-RVFB ELISA	56
2.2.2.7	Bestimmung von Antikörpern gegen das Krim-Kongo-Hämorrhagische Fieber-Virus.....	58
2.2.2.7.1	EUROIMMUN anti-CCHFV IIFT.....	58
2.2.2.7.2	ELISA-Teste zur Bestimmung von anti-CCHFV Antikörpern.....	58
2.2.2.7.2.1	ELISA Nr. 1.....	58
2.2.2.7.2.2	ELISA Nr. 2.....	60
2.2.2.7.2.3	ELISA Nr. 3.....	61
2.2.2.7.2.4	ELISA Nr. 4.....	61
2.2.3	Statistische Methoden	62
2.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	63
2.2.4.1	Isolierung viraler RNA aus Zellkulturüberständen	64
2.2.4.2	Reverse Transkription von viraler RNA.....	64
2.2.4.3	Polymerasekettenreaktionen.....	65
2.2.4.4	SuperScript™ OneStep RT-PCR mit Platinum® Taq	66
2.2.4.5	Mykoplasmen-PCR.....	67
2.2.4.6	Kolonie-PCR.....	67
2.2.4.7	Sequenzierung von DNA.....	68
2.2.4.8	Phylogenetische Analyse.....	68
2.2.4.9	Agarosegel-Elektrophorese von DNA.....	69
2.2.4.10	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	69
2.2.4.11	Restriktionsverdau von DNA	69
2.2.4.12	Ligation von DNA-Fragmenten.....	70
2.2.4.13	Klonierungen mit Hilfe des QIAGEN PCR Cloning Kits.....	70
2.2.4.14	Kultivierung von <i>E.coli</i> -Bakterien	71
2.2.4.15	Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien	71
2.2.4.16	Transformation von <i>E.coli</i> -Bakterien.....	72
2.2.4.17	Isolierung von Plasmid-DNA.....	72
2.2.4.18	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	73
2.2.4.19	Transfektion von eukaryotischen Zellen zur IIFT-Herstellung	73
2.2.4.20	Transfektion von eukaryotischen Zellen zur Analyse im Western Blot	74
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden	75
2.2.5.1	Proteinisolierung aus Zellen und Zellkulturüberstand.....	75
2.2.5.2	Messung der Proteinkonzentration.....	75
2.2.5.3	Western Blot.....	75
3	Ergebnisse.....	79

3.1	Evaluierung des anti-Chikungunya-Virus IIFTs	79
3.2	anti-Japanisches Encephalitis-Virus IIFT	83
3.2.1	Evaluierung des anti-Japanische Encephalitis-Virus IIFTs	83
3.2.1.1	IgM-Evaluierung	84
3.2.1.2	IgG-Evaluierung.....	86
3.2.2	Untersuchung der Kreuzreaktivitäten und der Antikörper-Prävalenz	88
3.2.3	Untersuchung des Verlaufs der IgM- und IgG-Antwort nach Impfung gegen Japanische Encephalitis.....	90
3.2.4	Sequenzierung und phylogenetische Untersuchung des Japanische Encephalitis-Virus Stammes.....	92
3.3	anti-Dengue-Virus Mosaik IIFT.....	94
3.3.1	Evaluierung des anti-Dengue-Virus IIFTs.....	94
3.3.2	Sequenzierung und phylogenetische Untersuchung der verwendeten Dengue-Virus-Stämme	97
3.4	anti-Sandfliegen-Fieber-Viren Mosaik IIFT	98
3.4.1	Evaluierung des anti-Sandfliegen-Fieber-Viren Mosaik IIFTs.....	98
3.4.2	Sequenzierung und phylogenetische Untersuchung der Sandfliegen- Fieber-Viren-Stämme	101
3.5	anti-Rifttalfeiber-Virus IIFT	103
3.5.1	Evaluierung des anti-Rifttalfeiber-Virus IIFTs.....	103
3.5.2	Sequenzierung und phylogenetische Untersuchung des Rifttalfeiber- Virus-Stammes.....	104
3.6	Herstellung und Evaluierung rekombinanter, serologischer Teste	106
3.6.1	anti-Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus Mosaik IIFT	106
3.6.1.1	Transfektionsprotokoll zur Herstellung des rekombinanten anti-Krim- Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus IIFTs	106
3.6.1.2	Evaluierung des anti-Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus Mosaik IIFTs	107
3.6.1.3	Austestung von weiteren Substraten zur Detektion von Antikörpern gegen das Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus	114
3.6.2	anti-Dengue-Virus NS1 Mosaik IIFT	116
3.6.2.1	Herstellung und Evaluierung eines rekombinanten anti-Dengue-Virus Testes.....	116
3.6.2.2	Evaluierung des anti-Dengue Virus NS1 Mosaik IIFTs	118
4	Diskussion.....	121
4.1	Generelle Herausforderungen der Testevaluierungen	122
4.2	Evaluierung des anti-Chikungunya-Virus IIFTs	123

4.3	Evaluierung des anti-Japanische Encephalitis-Virus IFTs und Untersuchung des Verlaufs der Immunantwort nach Impfung gegen Japanische Encephalitis.....	125
4.4	Evaluierung des anti-Dengue-Virus Mosaik IFTs	128
4.5	Evaluierung des anti-Sandfliegen-Fieber-Viren Mosaik IFTs	132
4.6	Evaluierung des anti-Rifttalfieber-Virus IFTs	133
4.7	Herstellung und Evaluierung rekombinanter, serologischer Teste.....	134
4.7.1	Herstellung und Evaluierung des anti-Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus IFTs und Austestung von weiteren Substraten	134
4.7.2	Herstellung und Evaluierung eines rekombinanten anti-Dengue-Virus NS1 Mosaik IFTs	137
4.8	Abschließende Betrachtung	141
5	Zusammenfassung.....	143
6	Summary.....	145
7	Referenzen.....	121
8	Abkürzungsverzeichnis	159
9	Liste der Vorab-Publikationen dieser Dissertation und weitere publizierte Artikel	161
10	Selbstständigkeitserklärung	162
11	Danksagung.....	163

1 Einleitung

1.1 Ausbreitung von Arboviren

Arboviren sind durch Arthropoden übertragene Viren. Zu den humanpathogenen Arboviren gehören z.B. das Dengue-, Gelbfieber-, und Riftalfieber-Virus. Die Arthropoden infizieren sich mit den Viren bei einer Blutmahlzeit. Diese replizieren daraufhin in den Verdauungsorganen, so dass die Arthropoden die Viren mit ihrem Speichel auf ihre Wirte übertragen können. Oft tragen befallene Arthropoden die Viren lebenslang in sich und zudem findet häufig eine transovariable und transstadielle Übertragung innerhalb der Arthropoden statt. Die meisten hochpathogenen Arboviren finden sich in den tropischen Regionen der Erde. Ihr Verbreitungsgebiet ist abhängig von ihrem jeweiligen Vektor, z.B. einer Zecken- oder Mückenart [1,2,3]. Schon seit langer Zeit wird beobachtet, dass sich die Verbreitungsgebiete der verschiedenen Arthropoden und damit in Folge auch die der jeweiligen assoziierten Viren aufgrund menschlicher Einwirkungen verändern.

Schon im 17. - 19. Jahrhundert verbreiteten sich *Aedes aegyptii* (*A. aegyptii*) Mücken mit den Sklaven- und Warenhandelsschiffen von Afrika über die ganze Welt. *A. aegyptii* gilt als einer der effizientesten Arbovirusvektoren und ist z.B. der Hauptvektor für das Dengue-Virus (DENV) und das Gelbfieber-Virus [3,4,5]. In den letzten Jahren beschleunigte sich jedoch die Ausbreitung verschiedener Vektoren. Gründe sind vor allem der vermehrte weltweite Handel und der damit einhergehende, unbeabsichtigte Transport der verschiedenen Arthropoden. Alleine der Schiffsverkehr ist beispielsweise zwischen 1993 und 2003 um mehr als 27 % gewachsen [6,7].

Ein Profiteur des zunehmenden, modernen, globalen Handels ist beispielsweise die Mückenart *Aedes albopictus* (*A. albopictus*), die in den letzten drei Jahrzehnten alle Kontinente erobert hat [4]. Ursprünglich war die Art nur in den Wäldern Südostasiens beheimatet, sie hat sich aber mit der Zeit an den Menschen und dessen Lebensraum angepasst. Die Ausbreitung ist vor allem auf den Handel von alten Autoreifen, die *A. albopictus* als Brutstätten nutzt, zurückzuführen [8,9]. Aber auch der Transport von exotischen Pflanzen (z.B. Bambus) an denen sich Eier finden, trägt zur Ausbreitung bei [10]. Die im Vergleich zu *A. aegyptii* bessere Anpassungsfähigkeit von *A. albopictus* ermöglichte es der Art sich schneller in den neuen Verbreitungsgebieten zu etablieren. Sie kann z.B. viele verschiedene natürliche und artifizielle Brutstätten nutzen und sich zudem viel weiter in den Norden ausbreiten, da die Eier von *A. albopictus* bei einer Temperatur von -5 °C in eine Art Ruhezustand übergehen können. *A. albopictus* kann außerdem an einer Vielzahl von Vertebraten saugen. Dadurch wird das Risiko einer Übertragung von zoonotischen Erregern zwischen verschiedenen Wirtssystemen erhöht [4].



Abbildung 1.1-1: *Aedes albopictus*
Quelle: Susan Ellis, Bugwood.org

Neben dem weltweiten Handel wird die Klimaerwärmung als zusätzlicher Faktor für die vermehrte Ausbreitung diskutiert, der es den Arthropoden und den Viren ermöglicht in anderen Habitaten Fuß zu fassen [11,12]. Beispielsweise hängt die Persistenz von *A. albopictus* von vier Klimafaktoren ab, die sich durch die Klimaerwärmung lokal verändern und somit zu einer weiteren Ausbreitung der Mücken führen können. Diese vier Faktoren sind: eine mittlere Winter-Lufttemperatur von 0 °C, eine mittlere Jahres-Lufttemperatur von 11 °C, eine mittlere Lufttemperatur im Juli von 20 °C (Optimum 25 - 30 °C)

und eine jährliche Niederschlagsmenge von 500 mm, mit ausreichend Regen im Sommer [13].

Die Ausbreitung von tropischen Erregern erfolgt höchstwahrscheinlich in dem sich zunächst die Arthropoden neue Verbreitungsgebiete suchen und die Erreger dann erst nachträglich z.B. durch infizierte Reisende oder weitere, infizierte Arthropoden in diese neuen Verbreitungsgebiete gebracht werden. Das Risiko der Infektion aller möglicher Vektor-Arthropoden-Populationen durch infizierte Immigranten oder Reisende, die aus tropischen Ländern zurückkehren steigt an, je weiter sich diese Arthropoden verbreiten und je mehr Reiseaktivität/Migration stattfindet [13,14]. In der Regel ist die Virämie, d.h. das Auftreten der Viren im Blut zeitlich zwar recht eng begrenzt (z.B. beim Dengue-Fieber 4 bis 5 Tage nach Krankheitsbeginn). Im Gegensatz zur langsameren Schiffsreise ist es jedoch im Flugverkehr möglich, dass infizierte, virämische Menschen sehr weite Strecken zurücklegen und die Viren in entfernte Regionen tragen [3]. Die Größe der Einschleppungsgefahr neuer Erreger in bestehende Arthropodenpopulationen wird deutlich, wenn man bedenkt, dass innerhalb der letzten 50 Jahre die Anzahl der Flugpassagiere jährlich durchschnittlich um etwa 9 % gestiegen ist [15,16,17].

Zusätzlich finden Arthropoden und die entsprechenden Viren durch das erhöhte Bevölkerungswachstum und die verstärkte Urbanisierung einfacher geeignete Wirte, die auf engstem Raum leben. Das heißt die Populationsdichte von Menschen, aber auch von Tieren spielt eine entscheidende Rolle für die Etablierung der Arthropoden und der tropischen Viren [2,18]. Diese Viren können dann umso schneller große Epidemien auslösen, je höher die Populationsdichte der Wirte, und die der Arthropoden ist.

Weitere Faktoren, die sich positiv auf die Ausbreitung von Arthropoden und Viren auswirken, sind fehlende Vektorkontrollprogramme, offene Wasserspeicherung in Behältern aufgrund fehlender Frischwassersysteme, mangelnde Abwasser- und Müllentsorgungssysteme, die Abholzung der Wälder im Zuge von Landgewinnung,

Bewässerungsprojekte und Massenevakuierungen. Viele dieser Faktoren sind indirekt wiederum auf unkontrolliertes Bevölkerungswachstum zurückzuführen [2,5,11,19].

Nicht zu vernachlässigen ist zudem die Tatsache, dass sich die Viren aufgrund ihrer genetischen Variabilität ebenfalls an andere, verwandte Vektoren anpassen und auf diese Weise eine weitere geographische Ausbreitung erlangen können. Dies wurde z.B. beim Chikungunya-Virus (CHIKV) beobachtet. Ursprünglich wurde das CHIKV hauptsächlich und am effektivsten von *A. aegyptii* übertragen, aber durch eine einzige Mutation (E1-A226V) konnte es sich schneller und effektiver in *A. albopictus* vermehren und somit die weite Verbreitung dieser Mückenart ausnutzen [11,20,21].

Die Viren, die sich geographisch ausbreiten werden in *emerging viruses* und *re-emerging viruses* eingeteilt. *Emerging viruses* sind Viren, die eine neue, nicht bekannte Infektion auslösen oder sich geographisch in neue Gebiete verbreiten und damit eine größere Bedeutung gewinnen, dazu gehören z.B. das Krim-Kongo hämorrhagische Fieber-Virus und das Rifttalfieber-Virus. *Re-emerging viruses* hingegen sind Viren, die in einem bestimmten geographischen Gebiet ehemals verbreitet waren und nach einer Zeit der Abwesenheit bzw. geringer Verbreitung wieder vermehrt auftreten [22].

Man kann davon ausgehen, dass auch in Zukunft immer wieder exotische Vektoren und Pathogene in neue geographische Gebiete eingeschleppt werden. Oftmals, v.a. bei fehlenden Vektorüberwachungsprogrammen, bleibt dies unbemerkt bis eine Epidemie oder ein anderes ungewöhnliches Ereignis eintritt. In diesem Fall hat sich dann möglicherweise der Vektor bzw. der Krankheitserreger jedoch schon etabliert und eine Eradikation aus dem neuen Gebiet nicht mehr möglich [2].

1.2 Diagnostik von Viren

Eine schnelle Diagnostik ist unerlässlich um eine eingeschleppte Krankheit erkennen, behandeln und im Notfall die nötigen Gegenmaßnahmen treffen zu können. Aber gerade die Diagnostik von tropischen Krankheiten wird in der Regel nur in spezialisierten Laboratorien angeboten und beruht oftmals auf *in-house* Testen [23]. Daher ist die Forschung an und Evaluierung von geeigneter und verlässlicher Diagnostik von tropischen Krankheiten essentiell.

Im Allgemeinen erfolgt die Diagnostik von Viren entweder über den direkten Virusnachweis wie z.B. per PCR, über eine Virusisolierung oder indirekt mittels serologischer Methoden, d.h. dem Nachweis virusspezifischer IgM- und IgG-Antikörper [24,25]. In Abbildung 1.2-1 ist ein allgemeines Schema eines Ablaufs einer viralen Infektion und der diagnostischen Möglichkeiten dargestellt.

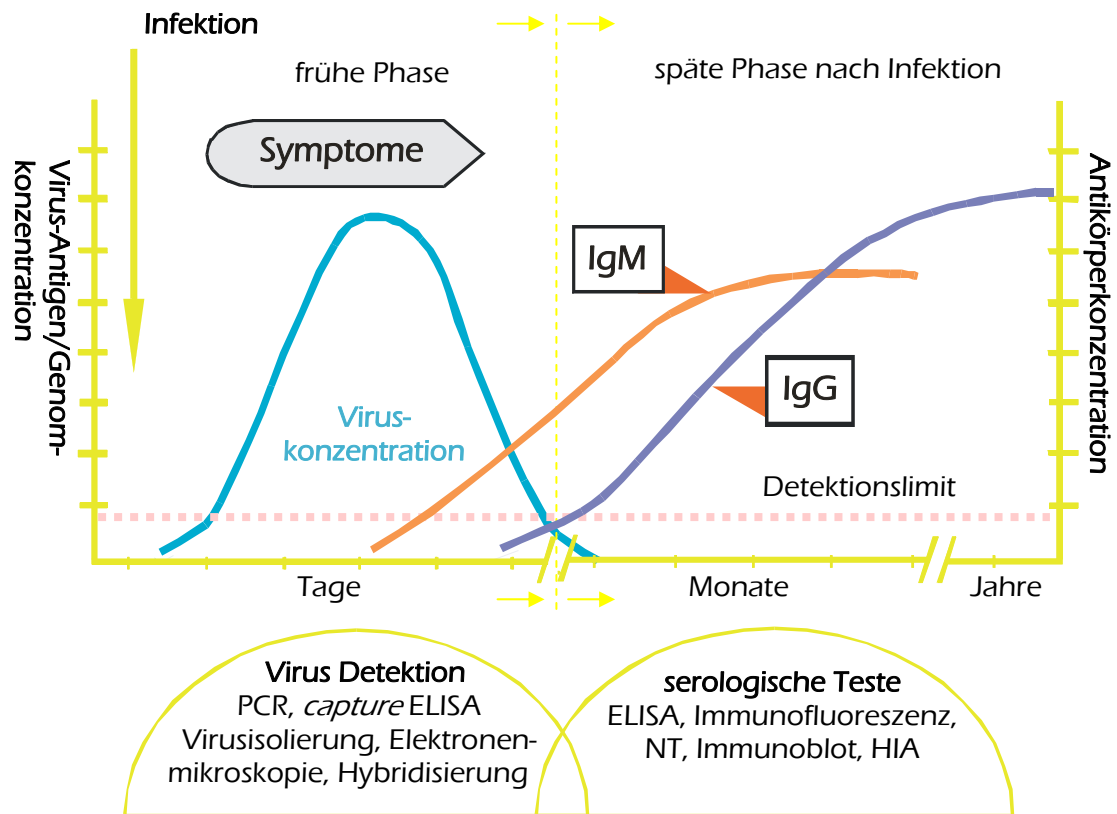


Abbildung 1.2-1: Schema einer Virusinfektion und der entsprechenden Diagnostik.

Der direkte Erregernachweis aus dem entsprechenden Untersuchungsmaterial kann über molekularbiologische, Antikörper-basierte oder elektronenmikroskopische Methoden erfolgen. Hierbei werden entweder die Viren selbst (und z.B. deren typischer zytopathischer Effekt), virale Proteine oder virale Genome detektiert. Die Virusanzucht aus dem Untersuchungsmaterial erfolgt in einem empfänglichen, lebenden Wirt, d.h. in der Regel in der Zellkultur, selten im Hühnerembryo oder im Versuchstier. Die Virusanzucht dauert jedoch lange und ist teuer, zudem führt sie nur in wenigen Fällen zur Diagnose, da in vielen Fällen die Virämie nur vor oder kurze Zeit nach Beginn der Symptome vorhanden ist [26]. Daher werden in der Routinediagnostik in den meisten Fällen virale Genome, die in der Regel längere Zeit nachweisbar sind, per PCR detektiert.

Die Bestimmung der virusspezifischen Antikörper wird genutzt um eine akute oder abgelaufene Infektion zu diagnostizieren oder aber um den Immunitätsstatus gegen ein bestimmtes Virus zu untersuchen. Unerlässlich ist der Antikörpernachweis zur Diagnostik von Viren, die nur schwer direkt nachzuweisen sind, bei denen z.B. schon kurz nach Krankheitsausbruch keine Viren oder Genome mehr im Blut detektierbar sind. Virus-spezifische Antikörper werden vom Organismus als Reaktion auf die virale Infektion gebildet, wobei jedoch die Kinetik der Antikörperproduktion für jedes Virus verschieden ist und von der Länge der Inkubationszeit abhängt. In der Regel sind zuerst virusspezifische IgM- und kurze Zeit später IgG-Antikörper nachweisbar. Der Titer der IgM-Antikörper fällt

langsam über die Zeit ab und ist oft nach 1 - 2 Monaten nicht mehr nachweisbar; der IgG-Titer ist dagegen in der Regel deutlich länger konstant [27]. Die alleinige Detektion von IgM-Antikörpern, ohne IgG-Antikörper, weist demnach auf eine akute Infektion hin, wohingegen die alleinige Detektion von IgG-Antikörpern eher auf eine zurückliegende Infektion hindeutet. Aber nicht immer sind IgM-Antikörper bei einer akuten Infektion nachweisbar und daher wird in der Regel ein 4-facher IgG-Titeranstieg in zwei konsekutiven Seren (entnommen im Abstand von 10 - 14 Tagen) ebenso als hinreichendes Kriterium für eine frische Infektion gewertet [24].

Zur Diagnose einer abgelaufenen Infektion bzw. zur Unterscheidung einer primären von einer sekundären Infektion mit dem gleichen Virus kann zusätzlich die Avidität der IgG-Antikörper gemessen werden. Dies erfolgt durch eine Inkubation mit einer Harnstofflösung, die die niedrig-aviden Antikörperbindungen löst, die hoch-aviden jedoch nicht [28].

Der Nachweis des virusspezifischen Antikörpertiters kann generell durch verschiedene serologische Methoden geschehen. Am weitesten verbreitet ist der Einsatz von *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). Der Nachweis von spezifischen Antikörpern in der Immunfluoreszenz (IF) ist eine weitere, seit langem verwendete Nachweismethode in der Virologie. Dafür werden Zellen infiziert, fixiert und mit Serum, sowie im Anschluss mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern inkubiert. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops werden die Zellen auf eine mögliche positive Reaktion untersucht. Die Methode war bis dato nur schwer zu standardisieren und daher nur für einzelne Proben zu verwenden. Die EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG hat mit der BIOCHIP Technologie, und der Titerplane™ Inkubationstechnik ein System entwickelt, dass die Immunfluoreszenz auch für Routinelabore attraktiv macht. Bei der BIOCHIP-Technologie handelt es sich um eine patentierte Methode [29], die zur Herstellung der indirekten Immunfluoreszenzteste (IIFT) verwendet wird.

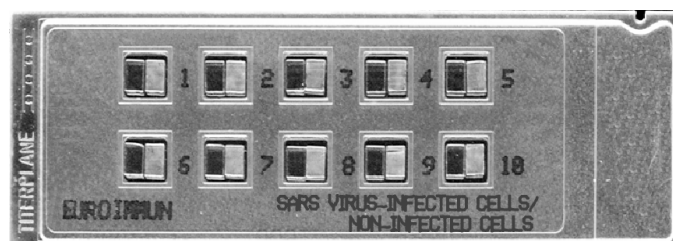


Abbildung 1.2-2: EUROIMMUN IIFT, bestückt mit je einem BIOCHIP mit infizierten und nicht-infizierten Zellen pro Reaktionsfeld.

Bei der Verwendung dieser Methode in der Infektionsserologie, werden Zellen auf großen Deckgläsern ausgesät, infiziert oder transfiziert und schließlich fixiert. Die Deckgläser werden anschließend maschinell in Millimeter-große BIOCHIPS geschnitten und auf die Reaktionsfelder aufgebracht. Es ist mit dieser Technologie möglich auf einem Objektträger

in ein Reaktionsfeld bis zu neun verschiedene Millimeter-große BIOCHIPs, mit verschiedenen Viren (oder auch anderen Substraten) aufzubringen (siehe Abbildung 1.2-2). Die auf diese Weise produzierten Objektträger werden mit der TiterplaneTM Technik inkubiert. Diese Inkubationstechnik macht es möglich, dass mit einer Patientenverdünnung die verschiedenen BIOCHIPs eines Reaktionsfelds parallel unter den gleichen Bedingungen inkubiert werden. Ein Reaktionsfeld kann BIOCHIPs mit unterschiedlichen Pathogenen enthalten, die z.B. das gleiche Krankheitsbild auslösen; es kann aber auch einen BIOCHIP mit infizierten und einen mit nicht infizierten Zellen enthalten, um unspezifische Reaktionen auszuschließen. Für diese Art der Inkubation wird nur eine geringe Serummenge benötigt. Der Nachweis der im Patientenserum vorhandenen Antikörper geschieht durch entsprechende Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelte anti-IgM- oder IgG-Antikörper.

Die Diagnostik vieler seltener, viraler Infektionserreger beruht häufig auf der Verwendung von *in-house* Testen, d.h. Teste die im eigenen Haus hergestellt und in der Regel auch evaluiert wurden. Die Teste liefern in vielen etablierten Laboratorien gute Ergebnisse, allerdings haben in der Regel nur wenige, spezielle Labore die Möglichkeit und Kapazität ausreichende Evaluierungen der Teste vorzunehmen. Kaum ein Labor kann zudem die umfangreichen Qualitätskontrollen leisten, die in den Richtlinien für *in vitro* Diagnostik für kommerzielle Diagnostika gefordert werden und die eine Bedingung für die Vergabe des CE-Zertifikats darstellen [30]. Dazu gehören Nachweise über die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse durch Inter- und Intra-Chargen Qualitätskontrollen, sowie Stress- und Langzeitstabilitätsteste der Reagenzien und der Kontrollen. Weiterhin müssen folgende Untersuchungen gemacht werden: die Austestung der Detektionsgrenzen, der Nachweis der Sensitivität und Spezifität, sowie der Antikörperprävalenz in der Bevölkerung, die Bestimmung der Detektion von kreuzreaktiven Seren, sowie der Ausschluss von möglichen Interferenzen lipämischer, hämolytischer oder ikterischer Proben.

Zudem kann nicht jedes Labor jeden Test im eigenen Haus herstellen, daher sind kommerzielle Teste eine Möglichkeit das Angebot an qualitativ hochwertigen Testen für verschiedene, auch seltene Erreger in einem Labor zu erhöhen. Wenn die Teste nicht nur in Speziallaboratorien gemacht werden können und Seren für die Diagnostik nicht mehr versandt werden müssen, verkürzt sich die Zeit bis zur Diagnosestellung.

Immer mehr Laboratorien müssen sich außerdem nach EN ISO/IEC 17025 und EN ISO 15189 akkreditieren lassen [31,32,33]. Dazu gehört, dass sie entweder ihre *in-house* Teste in aufwendiger Weise standardisieren, oder aber bereits CE-zertifizierte oder FDA-genehmigte Teste verwenden. Der Vorteil der kommerziell angebotenen Teste ist ihre gleichbleibend hohe Qualität und gerade bei kommerziellen Testen ist eine gute und umfassende Evaluierung der Sensitivität und Spezifität des Testes von größter Bedeutung. Ein kommerzieller Test wird auch von Laboratorien verwendet werden, die in der

Diagnostik seltener Viren unerfahrenen sind und denen keine weiteren Referenzmethoden zur Verfügung stehen. Demnach muss sich solch ein Labor auf die hohe Qualität der Testergebnisse verlassen können und die Möglichkeit haben, die Ergebnisse mit Hilfe von Sensitivitäts- und Spezifitätswerten, sowie mit positiven und negativen Vorhersagewerten einzuordnen.

Die Sensitivität drückt die Wahrscheinlichkeit aus, dass z.B. ein positives Serum auch durch ein positives Ergebnis erkannt wird, die Spezifität hingegen gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein negatives Serum als negativ erkannt wird. Der positive Vorhersagewert zeigt die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Person mit einem positiven Test-Ergebnis auch tatsächlich positiv ist, während der negative Vorhersagewert die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der eine Person mit einem negativen Test-Ergebnis tatsächlich nicht positiv ist [34].

In Kooperation mit der Firma EUROIMMUN wurden Immunfluoreszenzteste für verschiedene Arboviren entwickelt bzw. evaluiert. Dabei handelte es sich um serologische Testsysteme für folgende Viren: Chikungunya-Virus, Japanisches Encephalitis-Virus, Dengue-Virus, Krim-Kongo hämorrhagisches Fieber-Virus, Riftalfieber-Virus, Sandfliegen-Fieber-Virus.

1.3 Chikungunya-Virus

Das CHIKV wird zu den *emerging viruses* gezählt. Es ist ein Alphavirus aus der Familie der Togaviren (siehe Abbildung 1.3-1). Togaviren haben ein 11 – 12 kbp großes, einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität, das für fünf Struktur- und vier Nicht-Strukturproteine kodiert. Es handelt sich um umhüllte Viren von ca. 60 – 70 nm Durchmesser [35].

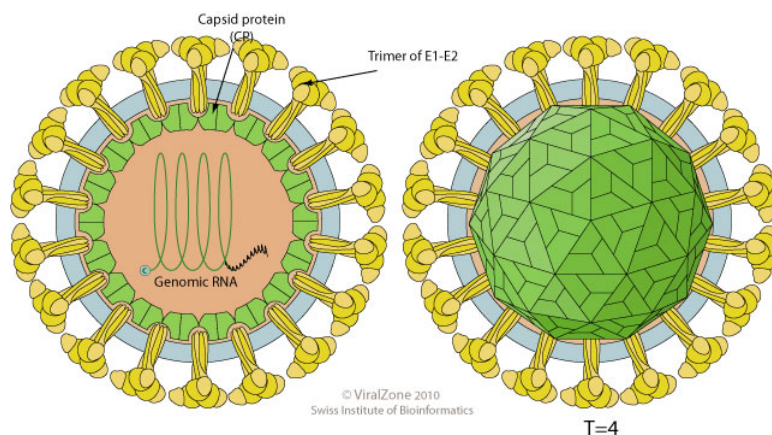


Abbildung 1.3-1: Schematische Abbildung eines Togavirus.

Quelle: ViralZone, www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics.

Das CHIKV wird durch den Stich infizierter *Aedes* Mücken übertragen. Es ist verbreitet in Afrika, Indien und Südostasien [36]. Es gibt einen sylvatischen und einen urbanen Übertragungszyklus. Der sylvatische Zyklus kommt nur in Afrika vor und beruht auf der

Infektion von Primaten durch sylvatisch vorkommende *Aedes* Mücken. Der urbane Zyklus, der u.a. auch in Asien vorkommt, beruht auf *A. aegyptii* und *A. albopictus* und ist ein Zyklus, der sich zwischen Mensch und Mücken abspielt [37]. Es gibt drei genetische Linien: eine asiatische Linie, eine westafrikanische Linie und eine ost-, zentral- und südafrikanische Linie (ECSA) [38].

Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch schnell einsetzendes, hohes Fieber, starke Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, Muskel- sowie starke Gelenkschmerzen, die zum Teil über Wochen bis Monate bestehen bleiben. Daher leitet sich auch der Name Chikungunya ab. Er kommt aus der Sprache der Makonde und heißt „der gekrümmt Gehende“. Die Krankheit kann nur symptomatisch behandelt werden [38]. In der Regel ist das Chikungunya- (CHIK-) Fieber jedoch selbstlimitierend und nicht tödlich. Allerdings wurde bei den aktuellen größeren Ausbrüchen eine erhöhte Mortalität in der Bevölkerung während der Epidemie festgestellt [39,40,41].

Seit 2005 gibt es vermehrt CHIK-Ausbrüche in Afrika und Asien, sowie 2007 auch erstmals in Europa. Die ersten Ausbrüche wurden 2005 von Kenia und den Komoren gemeldet. Im Anschluss gab es große Ausbrüche auf den Inseln in der süd-westlichen Region des Indischen Ozeans, auf Mauritius, den Seychellen, Madagaskar und La Réunion. Auf La Réunion, der am schwersten betroffenen Insel, wurden 266.000 Fälle gemeldet (34 % der Bevölkerung). Im Oktober 2006 kam es zum Ausbruch auf dem indischen Subkontinent mit mehr als 1,4 Millionen Erkrankten, der sich in der Folge in den Ländern Südostasien ausbreitete [37,42,43,44,45,46]. Phylogenetische Studien haben gezeigt, dass die Ausbrüche im Indischen Ozean und auf dem indischen Subkontinent durch Stämme ausgelöst wurden, die mit den ost-afrikanischen Isolaten verwandt sind [36,45,47]. Im Jahre 2007 kam es dann zu einer CHIK-Epidemie in Nord-Italien, wo *A. albopictus* seit 1990/91 vorkommt. Bei diesem Ausbruch wurde das CHIKV durch einen infizierten Reisenden eingeschleppt und durch die vorhandenen *A. albopictus* Mücken kam es zu einer Übertragung mit 217 Infizierten [48,49,50]. Es konnte jedoch verhindert werden, dass sich die Krankheit in Europa manifestierte. Im September 2010 wurde jedoch erneut ein autochthoner CHIK-Fall gefunden, diesmal allerdings in Südfrankreich [51].

Im Laufe der Epidemie in Afrika und Asien ist es zu einer Mutation im E1-Protein des CHIKV gekommen (A226V) [45], die seitdem in Indien in 90 % der isolierten Viren gefunden wurde [52,53,54]. Diese Mutation verändert die Cholesterol-Abhängigkeit der Viren und ermöglicht eine effiziente Übertragung durch die weit verbreitete *A. albopictus* Mückenart.

Da die CHIK-Symptome den Symptomen verschiedener fieberhafter Infektionen gleichen, ist eine klinische Diagnose oft nicht möglich. Im Besonderen ist die Differentialdiagnose des Chikungunya- und Dengue-Fiebers schwierig, da sich die Symptome sehr ähneln, beide Krankheiten in ähnlichen geographischen Gebieten vorkommen und von den

gleichen Vektoren übertragen werden können. Daher kommt der Labordiagnose eine besondere Bedeutung zu [55]. Die Inkubationszeit beträgt durchschnittlich 2 - 4 Tage, möglich sind 1 - 12 Tage [44]. Bis zum 7. Tag nach Beginn der Erkrankung wird der Genomnachweis mittels RT-PCR zur Diagnosestellung empfohlen. IgM- und IgG-Serokonversion kann mehr oder weniger gleichzeitig 1 - 6 Tage nach Eintritt der klinischen Symptome nachgewiesen werden [56,57]. IgM-Antikörper sind bei der Hälfte der CHIK-Erkrankten noch 13 - 18 Monate nach Infektion detektierbar [58].

Die seit 2005 in vielen Ländern der Welt auftretenden CHIK-Ausbrüche haben einen Mangel an kommerziell hergestellter Diagnostik aufgedeckt. In Europa z.B. haben die erkrankten Reiserückkehrer eine vermehrte Nachfrage nach CHIKV-Diagnostik bewirkt und spätestens der Ausbruch in Italien hat gezeigt wie schnell es auch zu einer größeren Epidemie in Europa kommen kann. Aber auch in den betroffenen asiatischen Ländern (Indien, Singapur etc.) ist der Bedarf an validierter Diagnostik gestiegen [59,60].

1.4 Japanisches Encephalitis-Virus

Die Japanische Encephalitis (JE) wird ausgelöst durch das Japanische Encephalitis-Virus (JEV), das zum Genus Flavivirus in der Familie der Flaviviridae gehört. Die behüllten Flaviviren haben einen Durchmesser von ca. 50 nm und besitzen ein positives, einzelsträngiges RNA-Genom von ca. 10,7 kb. Das entstehende Polyprotein kodiert für drei Struktur- und sieben Nicht-Strukturproteine (siehe Abbildung 1.4-1).

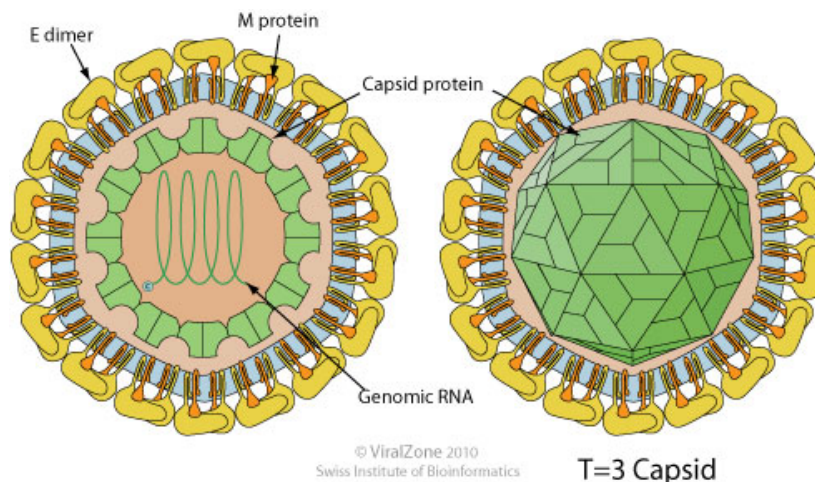


Abbildung 1.4-1: Schematische Abbildung eines Flavivirus.

Quelle: ViralZone, www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics.

JEV ist in Asien weit verbreitet und wurde bis hin zur Nordspitze Australiens gefunden [61]. Insgesamt leben drei Milliarden Menschen in endemischen Gebieten [62,63]. Damit ist JE die am weitesten verbreitete virale Encephalitis in Asien. Mindestens 50.000 apparente Japanische Encephalitis-Fälle werden pro Jahr gezählt, v.a. bei Kindern und das

obwohl verschiedene Impfungen erhältlich sind, durch die die Erkrankung verhindert werden kann [62,63,64].

JEV wird durch Mücken der Gattung *Culex*, vor allem *Culex tritaeniorhynchus*, übertragen. In endemischen Gebieten sind ca. 3% der Mücken infiziert [62]. Es gibt einen enzootischen Infektionskreislauf zwischen hoch virämischen Schweinen und Wasservögeln, aber es kann auch durch Zugvögel zur Verbreitung in andere Regionen kommen. Im Gegensatz zu Schweinen und Vögeln sind Menschen und Pferde Fehlwirte, die zwar Symptome entwickeln, aber eine zu geringe Viruslast im Blut für eine Infektion der Überträgermücken haben. Menschliche Infektionen sind meist auf infizierte Schweine zurückzuführen und kommen vor allem in ländlichen Gebieten vor, manchmal jedoch auch in Städten oder am Rande von Städten [65].

Das klinische Bild einer JEV-Infektion variiert von einer unspezifischen fiebrigen Erkrankung zu einer schweren Meningoencephalitis, dem Hauptkrankheitsbild. Nur eine von 250 - 500 Infektionen verläuft symptomatisch. Nach einer Inkubationszeit von 4 - 14 Tagen zeigen die Patienten meist schnell einsetzendes Fieber, Kopfschmerzen und gastrointestinale Symptome, gefolgt von neurologischen Symptomen, die von Nackensteifheit, Benommenheit, und Bewusstseinsstrübung zu Krämpfen, Parkinson-ähnlichen Bewegungsstörungen, schlaffen Lähmungen und Koma reichen. Es kann sich ein meningitisches und/oder encephalitisches Bild entwickeln. Die Krankheit kann nur symptomatisch behandelt werden. Die Letalität variiert zwischen 8 und 30% und von den Überlebenden weisen 30 - 50% neurologische Langzeitfolgen auf [1,64,65,66,67,68,69].

Da das klinische Bild klinisch nicht gut von anderen Encephalitiden unterschieden werden kann [70], kommt der Labordiagnose durch Antigen- bzw. Antikörperbestimmung große Bedeutung zu. Die Kultivierung von JEV aus Blut und Liquor ist allerdings nur wenige Tage nach Krankheitsausbruch möglich und meistens negativ, daher bekommen die serologischen Tests einen hohen diagnostischen Stellenwert [63,65,69].

Es gibt verschiedene JE-Impfstoffe. Von asiatischen Firmen wird ein Formalin-inaktivierter, auf Mäusegehirnen angezüchteter JE-Impfstoff (Stämme Nakayama und Beijing-1) hergestellt. Dieser Impfstoff war lange Zeit der am weitesten verwendete Impfstoff. Nur eines dieser Impfstoffprodukte (JE-VAX®) wurde in nicht-endemischen Ländern zugelassen. Der von chinesischen Herstellern entwickelte Lebendimpfstoff SA₁₄₋₁₄₋₂, der hauptsächlich auf primären Hamsternierenzellen hergestellt wird, ist inzwischen in endemischen Ländern sehr weit verbreitet [71]. Im Moment befinden sich weitere JE-Impfstoffe in der Entwicklung oder im Lizenzierungsprozess, z.B. ein chimärer, attenuierter Lebendimpfstoff, der auf dem Gelbfieber-Virus 17D-Genom basiert. Vor Kurzem ist zudem ein neuer, auf Vero-Zellen produzierter, Formalin-inaktivierter JEV-Impfstoff (IXIARO®) in den USA, Europa und Australien zugelassen worden [63,72,73].

Meist haben Reisende ein geringes Infektionsrisiko, allerdings wurden in der Literatur durchaus reiseassoziierte Infektionen beschrieben und das Risiko variiert letztendlich mit der Länge des Aufenthalts, der Jahreszeit, dem Ort und dem Zweck des Aufenthalts in den endemischen Gebieten. Es sollte daher für jeden Reisenden individuell betrachtet werden, auch bei kurzzeitigem Aufenthalt [74,75,76,77].

Zur Diagnose von JEV werden v.a. *in-house* Teste, sowie kommerzielle IgM-*capture* ELISAs verwendet.

1.5 Dengue-Virus

Das Dengue-Virus (DENV) gehört zum DEN-Antigenkomplex des Genus Flavivirus in der Familie Flaviviridae [78]. Es hat wie das JEV ein ca. 10,7 kbp großes Genom in Plusstrang-Orientierung, das für ein Polyprotein kodiert, das posttranslational in die Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten wird. Zu den am stärksten immunogenen Proteinen der Flaviviren gehören das E- und das prM/M-, sowie das NS1-Protein (siehe Abbildung 1.4-1). Die Strukturproteine E- und prM/M-Proteine finden sich auf der Virenoberfläche, während das NS1-Protein in verschiedenen Formen und in verschiedenen Zell-Kompartimenten vorkommt. In den Zellen und auf der Zelloberfläche liegt es vor allem als Homodimer vor, während es als lösliches Hexamer von den Zellen freigesetzt wird. Es spielt eine Rolle in der viralen RNA-Replikation, bei der Signaltransduktion und es aktiviert Komplement [79,80,81].

Weltweit leben 2 - 5 Milliarden Menschen in den tropischen und subtropischen Verbreitungsgebieten des DENV und man geht davon aus, dass sich 50 - 100 Millionen Menschen weltweit jährlich infizieren und ca. 25.000 davon sterben. Damit ist das Dengue-Fieber die häufigste Arthropoden-übertragene Erkrankung beim Menschen [2,19,82,83]. In endemischen Gebieten findet man z.T. eine Seroprävalenzrate von über 50 % [84]. Das Reservoir für DENV sind in urbaner Umgebung die Menschen, damit ist es zusammen mit CHIKV das einzige Arbovirus, das unabhängig von anderen Wirten existieren kann und nicht auf den sylvatischen Zyklus angewiesen ist [85]. Im urbanen Zyklus wird das DENV vor allem durch zwei verschiedene Vektoren übertragen: *A. aegyptii*, der Hauptvektor, sowie *A. albopictus*. In sylvatischer Umgebung in Afrika und Asien dienen Affen als Reservoir und andere Aedes Arten als Vektoren [3].

Es gibt vier verschiedene Serotypen des DENV, die genetisch und serologisch unterschieden werden können. Die neutralisierenden Antikörper, die bei einer Infektion mit einem der Serotypen gebildet werden, sind Serotyp-spezifisch, d.h. diese Antikörper schützen gegen eine Infektion mit dem gleichen Serotyp, aber nur teilweise und kurzfristig gegen eine Infektion mit einem der anderen Serotypen [86,87,88]. Zusätzlich zu den neutralisierenden, Serotyp-spezifischen Antikörpern werden bei einer Infektion jedoch

auch nicht-neutralisierende, kreuzreagierende Antikörper gebildet. Dabei handelt es sich um Antikörper, die an alle vier Serotypen binden können [5,78,89].

Die DENV kommen inzwischen in Süd- und Mittelamerika, der Karibik, Afrika, Süd- und Südostasien und in bestimmten pazifischen Gebieten vor [90]. Insgesamt ist die Inzidenz der Erkrankung in den letzten 50 Jahren um das 30fache angestiegen und man findet vermehrt Epidemien in ländlicher Umgebung. Zuvor waren vor allem die Städte und Vorstädte betroffen [5,91]. Man spricht von hyperendemischen Gebieten, wenn in dem entsprechenden Gebiet mehr als ein DENV-Serotyp auftritt. Es zeigt sich zurzeit eine weitere Ausbreitung der hyperendemischen Gebiete und Zunahme der Erkrankungen und der schweren Verlaufsformen, auch bei Reisenden [1,3].

Früher unterschied man, je nach Schweregrad der Erkrankung, das Dengue-Fieber (DF) und das Dengue Hämorrhagisches Fieber/Dengue Schock Syndrom (DHF/DSS) [92]. Die WHO hat allerdings vor Kurzem neue Kriterien zur Dengue-Diagnostik eingeführt. Danach unterscheidet man Dengue (mit oder ohne Warnsignale für schwere Verläufe) von schweren Dengue-Verläufen [5]. Man unterscheidet drei Phasen der Erkrankung, die fiebrige, die kritische und die Besserungsphase. Die fiebrige Phase dauert etwa 2 - 7 Tage. Die Patienten zeigen neben dem Fieber, eine Gesichtsrötung, Hautausschlag, Muskel-, Gelenk- und Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, Halsschmerzen und leichte Hämorrhagien, sowie eine Leukopenie [5,93]. Die zweite Phase ist die kritische Phase, die einsetzt wenn das Fieber abfällt (meist Tag 3 - 7) und ist durch ein unterschiedlich starkes Austreten von Plasma ins Gewebe gekennzeichnet ist. In dieser Phase muss auf bestimmte Warnzeichen geachtet werden, die den Übergang zur schweren Dengue-Erkrankung kennzeichnen. Diese schweren Dengue-Verläufe sind charakterisiert durch ein ausgeprägtes Austreten von Plasma in umliegendes Gewebe, ausgeprägte Hämorrhagien und durch schwere Organbeeinträchtigungen, bis hin zum Schock. Im Falle einer schweren Dengue-Erkrankung erfolgt die Behandlung symptomatisch durch Flüssigkeitsinfusionen. Bei behandelten Patienten mit schweren Verläufen liegt die Mortalität bei ca. 1 - 2,5 %, in unbehandelten Patienten kann sie jedoch 20 % übersteigen [5,91].

Es gibt unterschiedliche Theorien für die Entwicklung der schweren Verläufe. Eine der drei Haupthypothesen ist das Phänomen des *antibody dependent enhancement* (ADE), d.h. der Antikörper-abhängigen Verstärkung der Infektion [94]. ADE tritt bei einer Sekundärinfektion mit einem zweiten Dengue-Serotyp bzw. bei dem Vorhandensein von nicht-neutralisierenden, maternalen Antikörpern auf. Die nicht-neutralisierenden Antikörper formen mit den Dengue-Viren einen Komplex, der über den Fc-Rezeptor des Antikörpers von den mononukleären Zellen aufgenommen werden kann; dadurch werden die mononukleären Zellen vermehrt infiziert [94,95,96,97]. Mit der ADE-Theorie lässt sich jedoch die Situation in der Realität nicht umfassend erklären. In einer aktuellen

Studie wurden z.B. Dengue-Fällen bei Reisenden überprüft. Die meisten Reisenden haben eine Primärinfektion mit einem Dengue-Serotyp, aber immerhin 1 - 3 % zeigen Symptome einer schweren Dengue-Erkrankung, d.h. ebenso viele wie in endemischen Gebieten [98]. Die zweite Hypothese besagt, dass das vermehrte Auftreten von schweren Dengue-Verläufen in einigen Epidemien mit unterschiedlich virulenten Virusstämmen erklärt werden kann. Man fand genetische Unterschiede in Virusstämmen, die mit unterschiedlicher Krankheitsschwere assoziiert waren [99,100,101,102,103].

Die dritte Haupthypothese beschäftigt sich mit dem Einfluss des genetischen Hintergrunds der Erkrankten [2,104]. Zusätzlich wurden allerdings noch andere Faktoren entdeckt, die eine Rolle in der Ausprägung der Dengue-Erkrankung im Individuum spielen. Dazu gehört der Geschlecht und Alter [3], sowie der Ernährungsstatus [105]. Wahrscheinlich ist ein Zusammenwirken aller Faktoren beteiligt an der Ausprägung der Schwere der Dengue-Erkrankung [5,100,106].

Die Viren können 4 - 5 Tage nach Symptombeginn im Blut nachgewiesen werden. In der ersten Phase der Erkrankung wird in der Regel eine Virusisolation, ein PCR-Nachweis oder ein Nachweis der spezifischen Proteine (z.B. NS1) durchgeführt. Das NS1-Protein ist im Blut von Tag 1 bis Tag 9, in einigen Seren sogar bis Tag 18 nachweisbar [107,108]. Am Ende der akuten Phase wird die Diagnose serologisch gestellt. Im Falle einer primären Infektion und ohne vorausgegangene Flavivirus-Impfung, sind IgM-Antikörper ab dem 3. - 10. Tag nachweisbar und bleiben für 2 - 3 Monate im Blut detektierbar. IgG-Antikörper sind nach ca. 7 Tagen nachweisbar. Bei einer sekundären Infektion steigt IgG viel früher an und in einigen Patienten ist kein IgM-Titer nachweisbar [92,109]. NS1-spezifische Antikörper können bei einer primären Infektion im Anschluss an das Auftreten der NS1-Proteine im Blut, also ab Tag 9 detektiert werden. Bei einer sekundären Infektion finden sich die entsprechenden Antikörper schon früher [110].

Eine Unterscheidung zwischen einer Primär- und einer Sekundärinfektion kann durch eine Bestimmung der Avidität der IgG-Antikörper, über die Bestimmung einer IgM/IgG-Ratio oder über einen Hämagglutinations-Inhibitions-Test geschehen [111,112].

Kreuzreagierende Antikörper zwischen den unterschiedlichen Serotypen erschweren eine Bestimmung des der Infektion zu Grunde liegenden Serotyps in herkömmlichen, serologischen Testen. Dies gelingt in der Regel nur mit Hilfe eines Neutralisationstestes, d.h. mit der Bestimmung der neutralisierenden Antikörper. Aber nicht nur die unterschiedlichen Serotypen kreuzreagieren sehr stark. Man findet Kreuzreaktivitäten zwischen allen Flaviviren, zu denen neben dem DENV z.B. auch das JEV, das Gelbfieber-Virus und das West-Nil-Fieber-Virus gehören. Da zum Teil mehrere Vertreter der Flaviviren in den gleichen geographischen Gebieten vorkommen, ist es mit den meisten diagnostischen Testen unmöglich die Antikörperantwort gegen die verschiedenen Viren zu unterscheiden [113]. Dementsprechend gibt es zunehmend Tendenzen die stark

immunogenen und möglichst gering kreuzreaktiven Proteine bzw. Proteinbereiche zu identifizieren und nur noch diese in den entsprechenden Testsystemen anzubieten [114,115,116]. Beispielsweise wurde das native NS1-Protein aus Zellkulturüberstand schon erfolgreich in einem *in-house* ELISA eingesetzt [115,117]. Eine Unterscheidung der Serotypen war möglich, da das NS1-Protein im Vergleich zum E- und prM-Protein weniger kreuzreaktive Epitope besitzt [97].

1.6 Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus

Das Krim-Kongo hämorrhagische Fieber-Virus oder *Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus* (CCHFV) gehört zur Familie der Bunyaviridae, Genus Nairovirus. Es handelt sich um umhüllte, ca. 100 nm große Viruspartikel. Wie bei allen Mitgliedern der Bunyaviridae besteht das negative Einzelstrang-RNA-Genom des CCHFV aus drei Segmenten. Das S- (small) Segment kodiert für das Nukleoprotein, das M- (medium) Segment für die Glykoproteine (G_N und G_C) und das L- (large) Segment für die RNA-abhängige RNA Polymerase [118,119]. Das Nukleoprotein ist das Hauptantigen des CCHFV [120,121] und rekombinant hergestellte Nukleoproteine wurden für verschiedene *in-house* ELISAs und IIFTs genutzt [122,123,124,125]. Das M-Segment kodiert für das GPC-Protein, das cotranslational in die zwei Vorläufermoleküle $preG_N$ und $preG_C$ gespalten wird. Aus diesen beiden Vorläufermolekülen entstehen danach posttranslational die beiden reifen Glykoproteine G_N und G_C . Beide Glykoproteine werden in die Virushülle eingebaut [126,127,128]. Sie sind für die Rezeptorbindung verantwortlich und induzieren neutralisierende Antikörper [118,120,129]. Abbildung 1.6-1 zeigt eine schematische Darstellung eines Bunyavirus.

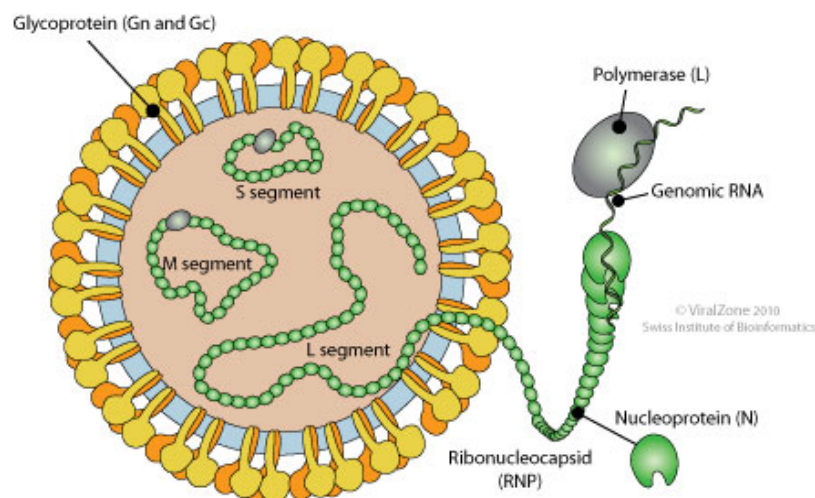


Abbildung 1.6-1: Schematische Abbildung eines Bunyavirus.

Quelle: ViralZone, www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics.

Das Virus ist geographisch in Afrika, Zentralasien, Ost- und Südost-Europa und im Mittleren Osten verbreitet. Damit ist es das nach dem Dengue-Virus am weitesten verbreitete medizinisch bedeutsame Arbovirus [130].

Es wird durch den Stich von Zecken übertragen, v.a. des Genus *Hyalomma*, deren Verbreitung größtenteils mit der Verbreitung von CCHF übereinstimmt [131]. Es kommt jedoch auch zur Übertragung durch *Rhipicephalus*- und *Dermacentor*-Zecken. Die Viren werden innerhalb der Zecken transstadiell und transovariell weitergegeben und können somit die Viren über eine lange Zeit übertragen werden [1,132]. Zecken der *Hyalomma* spp. und andere Zeckenarten, werden regelmäßig durch Zugvögel in bis dahin von den Zecken unbesiedelte Gebiete eingeschleppt [133,134,135,136].

Es wird vermutet, dass durch den Klimawandel das Risiko ansteigt, dass CCHFV sich auch in Europa etabliert, durch die Ausbreitung der Vektoren und der entsprechenden Reservoir-Tiere. Diese könnten von milderem Wintern und vermehrtem Regen profitieren [137].

Als Reservoir dienen neben den Zecken selbst u.a. Kaninchen, Igel und Ratten, sowie Tiere in der Viehzucht. Diese Tiere zeigen oft nur inapparente Symptome [138,139,140,141,142,143]. Der Kontakt mit virämischem Blut oder Gewebe beim Schlachten ist eine häufige Ansteckungsquelle für Menschen. Zudem kommt es häufig zu nosokomialen Infektionen [144].

Es handelt sich beim CCHF um ein schwer verlaufendes, hämorrhagisches Fieber mit einer Letalität von 5 - 50 % [131,145]. Man kann die Erkrankung in vier Phasen einteilen: Inkubation (3 - 7 Tage), prehämorrhagische Phase (1 - 7 Tage), hämorrhagische Phase (2 - 3 Tage) und Rekonvaleszenz [145]. Die Inkubationszeit kann je nach Übertragungsweg variieren. Bei einer Infektion über Zecken beträgt sie 3,2 Tage, über infiziertes, tierisches Gewebe 5 Tage und nosokomial 5,6 Tage [138]. Die Krankheit beginnt abrupt mit Fieber, Schüttelfrost, Benommenheit, schweren Kopf-, Rücken-, Rumpf- und Muskelschmerzen, Photophobie, Übelkeit, Diarrhoe, neurologischen Veränderungen und weiteren unspezifische Symptomen. In schweren Fällen kommt es zum schnellen Übergang zur hämorrhagischen Phase mit disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC), Blutungen, die von Petechien bis zu starken Schleimhautblutungen reichen können, und Schock. [131,145,146,147,148].

Die CCHFV-Stämme können durch eine phylogenetische Analyse der S-Segmente in sieben Virusgruppen eingeordnet werden. Jedoch gibt es bei einigen Gruppen große geographische Unterschiede, z.B. gehören Viren aus Südafrika und West-Afrika zu einer Gruppe, sowie Viren aus dem Irak und China. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Viren über große geographische Distanzen transportiert werden, z.B. über Viehtransporte oder über Zecken auf Zugvögeln [149,150].

Eine frühe Ribaviringabe innerhalb der ersten 15 Tage, vor dem Eintritt in die

hämorrhagische Phase, verbessert die Heilungsaussichten [145,151]. Daher ist eine frühe Diagnostik sowohl für den Patienten selbst wichtig, als auch um nosokomiale Infektionen zu verhindern [131]. Die Diagnostik beruht sowohl auf dem direkten Virusnachweis durch Virusisolation und der Detektion viraler RNA durch *real time*-PCR (RT-PCR), wie auch auf der Detektion von spezifischen Antikörpern [152]. IgM- und IgG-Antikörper sind in der Regel ab dem 4. und 9. Erkrankungstag nachzuweisen [153,154]. Die Entwicklung von IgM-Antikörpern ist ein diagnostischer Marker in überlebenden Patienten [145]. Die IgM-Titer der überlebenden Patienten fallen innerhalb von vier Monaten wieder auf sehr niedrige bzw. nicht detektierbare Level ab; IgG-Titer bleiben in der Regel 5 Jahre nachweisbar [153]. Eine kürzlich abgeschlossene oder eine andauernde Infektion wird durch eine Serokonversion oder durch einen mehr als vierfachen IgG-Titeranstieg in zwei nacheinander entnommenen Serumproben, oder aber durch einen IgM-Antikörpertiter in einer einzigen Probe bestätigt [131]. Die CCHFV-Diagnostik von humanen Seren beruht vor allem auf laboreigenen *in-house* Testen bzw. einem Test des amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention (CDC), der speziellen Laboren zur Verfügung gestellt wird.

1.7 Riftalfieber-Virus

Riftalfieber-Virus oder *Rift Valley Fever Virus* (RVFV) gehört zur Familie der Bunyaviridae, Genus Phlebovirus. Es handelt sich, wie auch das CCHFV, um ein in drei Segmente geteiltes, negativ orientiertes, einzelsträngiges RNA-Virus (siehe Abbildung 1.6-1).

Das Virus wird vor allem durch infizierte Stechmücken übertragen, eine Infektion durch andere Arthropoden (z.B. Zecken und Sandmücken) ist jedoch ebenfalls möglich. Viele verschiedene Mücken-Genera, wie z.B. *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* etc., können als Vektoren fungieren. Eine aerogene Übertragung oder eine Übertragung durch Kontakt zu infiziertem Gewebe ist ebenfalls möglich [1,155].

Prinzipiell handelt es sich um einen tierpathogenen Erreger, der große Epidemien v.a. bei Wiederkäuern auslöst. Im Zusammenhang mit den Epidemien der Nutztiere kommt es regelmäßig zur Infektion von Menschen, v.a. durch Kontakt mit Blut von infizierten Tieren sowie durch den Stich von infizierten Mücken.

Den Epidemien gehen meist sehr heftige Regenfälle voraus, so dass sich infizierte Mückeneier aus der vorangegangenen Saison in kleinen Wasserpools entwickeln können und somit die Anzahl der Überträgermücken stark ansteigt. Es ist möglich diese Epidemien, die über große geographische Gebiete verbreitet auftreten anhand der Wetterdaten relativ genau vorauszusagen [2,3]. Ein Vertebraten-Reservoir für die inter-epidemischen Phasen ist bis jetzt nicht entdeckt worden. Im Zuge von RVFV-Infektionen bei Tieren

kommt es zu einer hohen Rate von Aborten und einer hohen Mortalität von neugeborenen Tieren [118].

Die Inkubationszeit beträgt 2 - 6 Tage und meist verläuft die Krankheit beim Menschen relativ mild mit Fieber, Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen und es ähnelt dem Dengue-Fieber [156]. Bei einem geringen Anteil der Infizierten entwickeln sich jedoch schwerere Formen des RVF. Eine okuläre Erkrankung findet man bei 0,5 - 2 % der Infizierten und bei 50 % von ihnen kommt es zu Spätfolgen (z.B. Erblindung). 1 % der Infizierten entwickeln eine Meningoencephalitis und < 1 % der Infizierten erkranken an der hämorrhagischen Form, in deren Verlauf ca. 50 % versterben [1,155]. Wirtsabhängig Faktoren, unterschiedlich virulente Stämme und Unterschiede bei Übertragungen sind für unterschiedlich schwere Verläufe verantwortlich [1].

Es gibt drei genetische Hauptlinien, die west-afrikanische, die ost-/zentral-afrikanische und die ägyptische Linie. Sequenzvergleiche haben jedoch aufgedeckt, dass es zwischen den einzelnen Linien zum Reassortment, d.h. dem Austausch von Segmenten gekommen ist [157].

Das RVFV gehört zu den *emerging viruses* und ist eine der bedeutendsten Zoonosen in Afrika. Es hat sich im Laufe der Jahre nahezu auf dem gesamten afrikanischen Kontinent und seit 2000 auch auf der arabischen Halbinsel in Saudi-Arabien und im Jemen [158,159] ausgebreitet. Es wird vermutet, dass durch die Klimaveränderung Epidemien in anderen Gebieten der Erde möglich werden könnten [11]. Empfängliche Mücken sind u.a. in Europa und Nord-Amerika verbreitet [156].

Die Diagnose beruht neben der Anzucht der Viren in der Zellkultur und dem Nachweis des viralen Genoms mittels RT-PCR auf der Detektion von IgM- und IgG-Antikörpern [118]. IgM-Antikörper sind für 2 - 3 Monate im Serum nachweisbar und können demnach herangezogen werden, um eine akute von einer abgelaufenen Infektion zu unterscheiden [156]. Bis dato sind allerdings keine CE-zertifizierten, serologischen Teste erhältlich.

1.8 Sandfliegen-Fieber-Viren

Auch die Sandfliegen-Fieber-Viren (SFV) gehören zu der Familie der Bunyaviridae, Genus Phlebovirus und sind wie das RVFV und CCHFV ein dreifach segmentiertes, negativ orientiertes, einzelsträngiges RNA-Virus (siehe Abbildung 1.6-1). Vom Genus Phlebovirus sind 68 verschiedene Serotypen bekannt, von denen mindestens vier verschiedene, humanpathogene SFV-Serotypen im europäischen Mittelmeerraum vorkommen: Sicilian (SFSV), Naples (SFNV), Toscana (TOSV) und Cyprus (CYPV) [160].

Sie werden durch Sandmücken (*Phlebotominae*) auf den Menschen übertragen. SFSV und SFNV haben die gleiche Verbreitung wie *Phlebotomus papatasi*, ihr Hauptvektor, d.h. sie sind im Mittelmeerraum, im Mittleren Osten und Zentralasien zu finden [161]. SFSV und

SFNV sind damit die am weitesten verbreiteten SFV. Die Vektoren für TOSV sind v.a. *Phlebotomus perniciosus* und *Phlebotomus perfiliewi*. TOSV-Infektionen wurden bis dato in Italien, Frankreich, Spanien, Slowenien, Griechenland, Zypern und der Türkei entdeckt [162].

Die geographische Verbreitung der Sandmücken ist, wie bei allen Arthropoden, abhängig von klimatischen Faktoren und kann sich daher durch die Klimaerwärmung verändern. Eine jährliche Durchschnittstemperatur von 10 °C ist für die Besiedlung mit Sandmücken ausreichend [163] und wurde in Deutschland v.a. entlang des Rheins und im Raum Köln/Bonn gemessen. In Baden-Württemberg und Rheinlandpfalz wurden vor kurzem zwei verschiedene Sandmücken-Spezies entdeckt (*Phlebotomus perniciosus* und *mascittii*). Man geht man aber von einer weiteren Verbreitung in Deutschland aus [164].

Bis jetzt konnten noch keine Vögel oder Säugetiere als Reservoir von der SFV identifiziert werden. In einigen Tieren konnten jedoch serologische Hinweise auf eine TOSV-Infektion gefunden werden. Zudem ist eine venerische und transovariable Übertragung innerhalb der Sandmücken belegt [162,165].

Die durch die verschiedenen SFV-Serotypen ausgelösten Symptome und Erkrankungen variieren sehr stark. Das klassische Krankheitsbild ist das Pappataci-Fieber (Sandfliegen-Fieber, Sandfly-Fieber, Dreitage-Fieber). Nach einer Inkubationszeit von 3-6 Tagen entwickelt sich abrupt ein hohes Fieber, das ca. 6-74 h andauert. Die Patienten zeigen u.a. Schüttelfrost, Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen, retrobulbäre Schmerzen, Photophobie, Appetitlosigkeit und gastrointestinale Beschwerden. Nach Abklingen der akuten Symptome kann die zum Teil verlängerte Konvaleszenzperiode von depressiven Verstimmungen begleitet sein [166,167,168].

Bei einer Infektion mit dem neurotrophen TOSV kommt es nach einer Inkubationszeit von einigen Tagen bis zu zwei Wochen, zu plötzlich einsetzendem Fieber und Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen und Muskelschmerzen. Es kann im Anschluss zur aseptischen Meningitis und seltenen Fällen zur Meningoencephalitis oder Encephalitis kommen. Die Patienten zeigen Nackensteifheit, Kernig-Zeichen und in einigen Fällen eine Bewusstseinsstrübung, Zittern, Lähmungen und einen Nystagmus. Meist jedoch ist der Verlauf günstig. TOSV-Infektionen sind wahrscheinlich zu einem gewissen Prozentsatz asymptomatisch bzw. präsentieren sich als eine selbstbegrenzende, fiebrige Krankheit ohne ZNS-Beteiligung [1,162,169,170,171].

Die Bevölkerung in endemischen Gebieten scheint sich in der Regel schon im Kindesalter mit den SFV zu infizieren, da eine hohe Antikörperprävalenz in einigen endemischen, mediterranen Gebieten von mehr als 50 % für SFSV bzw. SFNV vorhanden ist [161,172]. Man findet jedoch eine geringe Rate von klinischen Infektionen unter der einheimischen Bevölkerung. Touristen oder Soldaten aus nicht-endemischen Gebieten erkranken hingegen häufiger [167]. Eine TOSV-Infektion sollte daher bei Patienten, die mit Fieber,

Kopfschmerzen und Meningitissymptomen aus Endemiegebieten zurückkommen in Betracht gezogen werden [173].

Die Antikörperantwort gegen SFV ist gekennzeichnet durch eine starke Kreuzreaktivität, v.a. zwischen TOSV und SFNV. Jedoch scheint eine Reaktion gegen den einen Serotyp keine vollständige Immunität gegen einen der anderen Serotypen zu gewähren [167,174].

Die Diagnostik der SFV beruht vor allem auf dem direkten Nachweis durch Anzucht, *real-time* PCR, sowie auf der Serologie. Spezifische IgM-Antikörper können im ELISA innerhalb der ersten Krankheitswoche detektiert werden. Sie fallen innerhalb von 3 – 14 Monaten wieder auf nicht detektierbare Titer ab [175]. IgG steigt langsam an und ist für mehrere Jahre nachweisbar [176]. IgG-Antikörper lassen sich ebenfalls im Liquor nachweisen [177]. Die Hauptantigene der SFV sind das N-Protein [178], sowie das G_N- und G_C-Protein [176]. Ein anti-TOSV ELISA und ein Blot, die auf einem rekombinant hergestellten Nukleoprotein beruhen, sind kommerziell erhältlich [179,180].

1.9 Zielsetzung

Ein Ziel der Promotionsarbeit war es die Entwicklung verschiedener kommerzieller Immunfluoreszenzteste durchzuführen und zu begleiten, sowie die umfangreichen Testevaluierungen zu organisieren und auszuwerten.

Die IIFTs zur Detektion von IgM- und IgG-Antikörpern gegen CHIKV, JEV, DENV, RVFV und SFV sollten dazu im etablierten, kommerziellen Verfahren mit Virus-Vollantigen hergestellt werden, im Rahmen dieser Arbeit mit charakterisierten Serumpaneln getestet und mit weiteren Diagnostikverfahren verglichen werden.

Des Weiteren sollte ein Verfahren der rekombinanten Expression von Virusantigenen in eukaryotischen Zellen entwickelt werden mit dem auch serologische Nachweissysteme für Erreger der biologischen Sicherheitsstufe 4 (BSL-4) produziert werden können, da die Vorschriften der BSL-4-Labore die herkömmliche Herstellungsart der diagnostischer Immunfluoreszenz-Testsysteme nicht erlauben. Exemplarisch sollten dazu das Nukleoprotein und die beiden Glykoproteine des BSL4-Erregers CCHFV rekombinant als IIFT-Substrat hergestellt werden.

Da ein rekombinanter Ansatz außerdem die Möglichkeit bietet Kreuzreaktivitäten zu reduzieren und eine höhere Spezifität der Tests zu erreichen indem nur einzelne Proteine oder Epitope eines Virus Verwendung finden, sollte weiterhin eine rekombinante IIFT-Strategie für die verbesserte serologische Serotypisierung von DENV-Seren entwickelt werden.

Beide rekombinante IIFTs sollten im Anschluss mit charakterisierten Serumpaneln evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaagen	BP 310 p L 610 D	Sartorius AG, Göttingen Sartorius AG, Göttingen
Autoklaven	Automat 21/2 Varioklav [®]	Webeco GmbH & Co KG, Bad Schwartau H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Brutschränke	Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fluoreszenz- Mikroskope	Innova 4230 Axioskop 20	New Brunswick Scientific, Edison, USA Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
	EUROSTAR II	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Gefrierschränke		Robert Bosch GmbH, München Liebherr GmbH, Biberach a.d. Riß
Gel-Dokumentation Gel-Elektrophorese	CN-3000.WL/LC EasyPhor Mini Protean [®] 3	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Biozym Scientific GmbH, Oldendorf Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glasschneider		EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Glasware Heizplatte mit Magnetrührer	Becher, Flaschen, etc. IKA [®] RH basic 2 und IKAMAG [®] Reo MR3001	Schott AG, Mainz IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Heizblöcke Invers- Lichtmikroskope	Thermomixer comfort Motic [®] AE21	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach Eppendorf AG, Hamburg Motic [®] , Speed Fair Co., Ltd., Xiamen, China
	Telaval 3 Biozero BZ-8100E	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena Keyence Corporation, Osaka, Japan
Invers- Fluoreszenzmikroskop Kamera für Fluoreszenzmikroskop	LU375C-I0	Lumenera Corporation, Ottawa, Kanada
Kühlschränke	-20 °C -20 °C -70 °C	Robert Bosch GmbH, München Liebherr GmbH, Biberach a.d. Riß Heraeus Holding GmbH, Hanau
Mikrotiterplatten- photometer Neubauer Zellzählkammer pH-Meter	GENios Pro [™]	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
	pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Photometer Pinzetten Pipettenhilfe	BioPhotometer Accujet [®] pro	Eppendorf AG, Hamburg Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Brand GmbH & Co KG, Wertheim

MATERIAL & METHODEN

Pipetten (bis 10 µL, 100 µL, 1.000 µL)	Reference [®] und Research [®] Finnpipette	Eppendorf AG, Hamburg
Sequencer	Pipetman [®] P SLpette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Gilson Inc., Middleton, WI, USA
	ABI PRISM [®] 3100 Genetic Analyzer	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
Sicherheitswerkbänke	Antair BSK	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
	BioCard Hood Hera Safe	The Baker Company, Sanford, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spannungsgeräte	Standard Power Pack P25 Model 200/2.0	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spatel (diverse)		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Stickstoffproben-lagerungstank		Union Carbide Coporation, Houston, USA
Temperierbad	Typ 1o13	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Thermocycler	Biometra T gradient cycler	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Thermodrucker	DPU-414	Seiko Instruments Inc., Japan
UV-Bestrahlungsgerät		EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
UV-Tisch	Transilluminator TC-312A	Spectronics Corporation, Westbury, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc, Bohemia, USA
Western Blot Apparatur	Fastblot B 34	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Zentrifugen	Biofuge Pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau
	Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
	Sigma 1-13	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
	Sigma 2K15	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
	Sigma 3K30C	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
	Centrifuge 5403 Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg

2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Einfrierröhrchen (1,8 mL)	Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold
Küvetten (Einmal-)	Eppendorf AG, Hamburg
Objektträger	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
PCR Reaktionsgefäße 0,2 mL, 8-fach-Streifen	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipetten-Filterspitzen (bis 10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipettenspitzen (bis 10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg
Quadripermschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsröhrchen (1,5 mL, 2,0 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsröhrchen (15 mL, 50 mL)	Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold
Röntgenfilme CL-XPosure TM	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Seropipetten (bis 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL,	Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold

25 mL, 50 mL)	
Sterilfilter (0,2 µm, 0,45 µm)	Millipore, Billerica, MA, USA
Whatman 3MMCHR Chromatography Paper	Whatman Internat. Ltd., Maidstone, UK
Zellkulturflaschen mit Filter (25 cm ³ , 75 cm ³ , 175 cm ³)	Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold
Zellkulturplatten (6er)	Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold

2.1.2 Chemikalien, Medien, Puffer und Gebrauchslösungen

Alle aufgeführten Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders erwähnt, mit *A. dest* angesetzt. Angegebene Prozentangaben sind, falls nicht anders erwähnt, in Volumenprozent.

2.1.2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (Mops)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid (X-Gal)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agar	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Agarose (NuSieve [®] 3:1)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Aqua dest.</i> Millipore	Robert Koch-Institut, Berlin
<i>Aqua mol. (molecular grade)</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dithiothreolin (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol (96 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Linz, Austria
Formaldehyd	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Glutamin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA Laboratories, Linz, Austria
Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Manganchlorid (MnCl ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Milchpulver Sucofin	TSI GmbH & Co. KG, Zeven
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Nitrocellulose (0,45 µm)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Penicillin/Streptomycin [2500 U/mL]	PAA Laboratories, Linz, Austria

Polyethylenimmin (PEI)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Propane-1,2,3,-triol (Glycerin)	Merck KGaA, Darmstadt
Rotiphorese Gel30 (Acrylamid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rubiniumchlorid (RbCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Linde AG, Pullach
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (Temed)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.2.2 Medien

Zellkulturmedien

Medium	zugesezte Reagenzien	Hersteller
DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)	5 – 10 % FKS, 2 mM Glutamin	GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MEM (Modified Eagles Medium) mit Earle's Salzen und Glutamin	5 – 10 % FKS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

weitere Medien

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
LB-Medium*	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl pH 7,5 (mit NaOH)	Robert Koch-Institut, Berlin
S.O.C. Medium		Invitrogen GmbH, Karlsruhe

*Flüssiges LB-Medium wurde autoklaviert und bei Bedarf mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt. Bei festem LB-Medium wurden zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

2.1.2.3 Puffer und Gebrauchslösungen

Name	Inhaltsstoffe	Hersteller
5 x ABI Sequenzierungspuffer		Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
5 x Superscript® II RT-Puffer		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
10 x Puffer für Restriktionsenzyme		Fermentas GmbH, St.Leon-Rot; New England Biolabs GmbH, Frankfurt
10 x Taq-Puffer		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
APS-Lösung	100 mg/mL APS	-
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent		Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Diluent Lösung	8 g/L NaCl 0,4 g/L KCl 0,06 g/L NaH ₂ PO ₄ 0,06 g/L KH ₂ PO ₄ 1 g/L Glucose 0,37 g/L NaHCO ₃ auf pH 7,0 einstellen Zugabe von 0,2 % EDTA	-

DNA Gelladepuffer (6 x)	5 mL Glycerin 40 mg Bromphenolblau 5 mL TBE	-
dNTP Mix	jeweils 10 mM	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Einfriermedium für Zellen	90 % FKS 10 % Glycerin	-
EUROSORB IgG/RF Absorbens		EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Harnstofflösung für Aviditätsbestimmung	8 M Harnstoff	-
IIFT-Eindeckmedium		EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
IPTG-Lösung	1 M IPTG	-
Laufpuffer (5 x) für Western Blot	15 g/L Tris 72 g/L Glycin 5 g/L SDS	-
Mercaptoethanol- Probenpuffer (MEPP) (4 x)	50 mM Tris; pH 6,8 40 % Glycerin 8 % β -Mercaptoethanol 4 g/L Bromphenolblau 80 g/L SDS	
Mops-Puffer (10x)	200 mM Mops 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA mit 10 M NaOH auf pH 7.0 einstellen, lichtgeschützt aufbewahren	-
M-PER Lysispuffer		Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
PBS (<i>phosphate-buffered saline</i>) Puffer	140 mM NaCl 2 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4 2 mM KH_2PO_4	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Ponceaurot-Lösung	20 g/L Ponceau S 3 % Trichloressigsäure	-
Probenverdünnungspuffer		EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Random Primer Schutzlösung	100 ng/ μL	Invitrogen GmbH, Karlsruhe EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer		Eppendorf, Hamburg
TFB I-Puffer	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl_2 100 mM RbCl 10 mM CaCl_2 15 % Glycerin pH mit 5,8 mit Essigsäure einstellen und steril filtrieren	-
TFB II-Puffer	10 mM MOPS 75 mM CaCl_2 10 mM RbCl 15 % Glycerin pH auf 7,0 mit KOH einstellen und steril filtrieren	-
WB (Western Blot)-Antikörper- verdünnungspuffer	1 % Milchpulver (w/v) in WB-Waschpuffer	-
WB (Western Blot)- Blockpuffer	10 % Milchpulver (w/v) in WB-Waschpuffer	-

WB (Western Blot)- Transferpuffer	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % Methanol	
WB (Western Blot)- Waschpuffer	0,1 % Tween20 in PBS	-
IIFT-Waschpuffer	0,2 % Tween20 in PBS	-
X-Gal-Lösung	20 mg X-Gal in 1 ml Dimethylformamid	-

2.1.3 Enzyme und Kits

2.1.3.1 Enzyme

Enzyme	Hersteller
Benzonase	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Restriktionsendonukleasen	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Frankfurt
BamHI	
KpnI	
NotI	
SacI	
XhoI	
Platinum [®] <i>Taq</i> -Polymerase [5 U/μL]	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Proteinase-Inhibitor Cocktail Set III	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Superscript II Reverse Transcriptase [200 U/μL]	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase [5 U/μL]	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

2.1.3.2 Kits

Diagnostische Kits

Name	Hersteller
Enzywell Toscana Virus IgG/IgM ELISA	DIESE Diagnostica Senese S.p.A., Monteriggioni, Italien
Chikungunyafiebertviren-IIFT	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Krim-Kongo-Fieber-Viren-Mosaik 2	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Dengue-Viren-Mosaik, Typen 1 bis 4	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Japanische-Encephalitis-Viren-IIFT	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Rift-Tal-Fieber-Viren-IIFT	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Sandfliegen-Fieber-Viren-Mosaik 1	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Gelbfiebertviren-IIFT	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Flaviviren-Profil 2	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
InBios JE Detect [™] IgG ELISA	InBios International Inc., Seattle, WA, USA
InBios JE Detect [™] IgM- <i>capture</i> ELISA	InBios International Inc., Seattle, WA, USA
recomLine Bunyavirus IgG/IgM	Mikrogen Diagnostik, Neuried

Pathozyme® Dengue G OD217	Omega Diagnostics Ltd., Alva, Scotland, UK
Panbio Japanses Encephalitis-Dengue IgM Combo ELISA	Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia

Sonstige Kits

Name	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Invitek GmbH, Berlin
Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit	Invitek GmbH, Berlin
MSB Spin PCRapace	Invitek GmbH, Berlin
QIAamp® Viral RNA Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Cloning Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
SuperScript® One-Step RT-PCR with Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SuperSignal® West Femto	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

2.1.4 Nukleinsäure- und Proteinstandards, Primer und Plasmide

2.1.4.1 Nukleinsäure- und Proteinstandards

Name	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Quick Load 100 bp Marker	New England Biolabs, Frankfurt
Quick Load 1 kb Marker	New England Biolabs, Frankfurt
TrackIt™ 100 bp DNA ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TrackIt™ 1 Kb Plus DNA ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.4.2 Primer

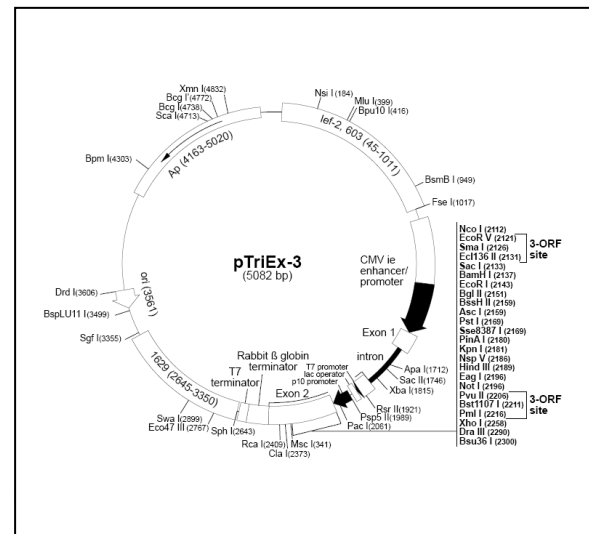
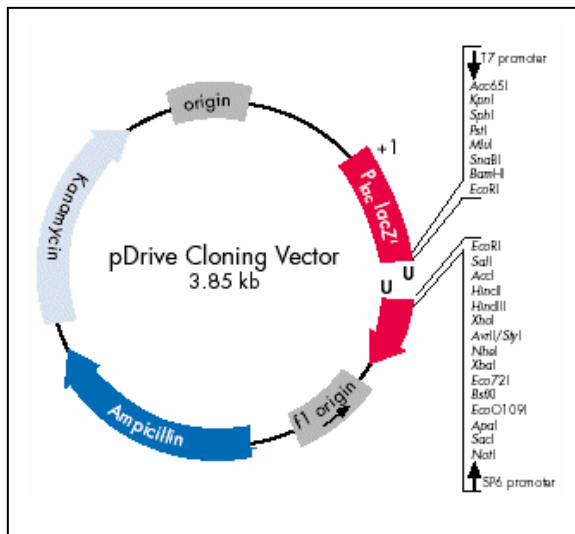
Name	Sequenz (5'-3')	Richtung	Position	Schmelztemperatur
T7 fw	TAATACGACTCACTATAGGG	sense	239–258 (in pDrive)	54
M13 fw	GTAAAACGACGGCCAGT	antisense	431–447	52
M13 rev	AACAGCTATGACCATG	sense	209–224	46
pTriEx-3 up	GTTATTGTGCTGTCTCATCA	sense	1881–1900	54
pTriEx-3 down	TCGATCTCAGTGGTATTTGTG	antisense	2356–2376	57
DENV-1 NS1 BamHI fw	CGGGATCCGGATTCCGGATGTGT AATTAAGTGG	sense	2382–2407	64
DENV-1 NS1 NotI rev	TAAAGCGGCCGCTGCAGAGACC ATTGACTTGACT	antisense	3417–3439	60
DENV-1 NS1 BamHI fw II	CGGGATCCGGGATTAATCAAG GAGACACGTC	sense	2296–2321	64
DENV-1 NS1 XhoI rev II	ACTCGAGTGCAGAGACCATTGAC CTAACT	antisense	3417–3439	60
DENV-2 NS1 SacI fw	CGAGCTCGATAGTGGTTGCGTTG TGAGC	sense	2422–2442	61
DENV-2 NS1 KpnI rev	GGGGTACCGGCTGTGACCAAGG AGTTAACC	antisense	3456–3477	64
DENV-2 NS1 SacI fw II	CGAGCTCGGAATGAACTCACGCA GCACC	sense	2335–2355	63
DENV-2 NS1 XhoI rev	ACTCGAGGGCTGTGACCAAGGA GTTAACC	antisense	3456–3477	64
DENV-3 NS1	CGGGATCCGGACATGGGGTGTG	sense	2413–2436	65

BamHI fw	TCATAAACTG			
DENV-3 NS1	TAAAGCGGCCGCTGCTGAGGCTA	antisense	3447–3469	63
NotI rev	GAGACTTTACCA			
DENV-3 NS1	CGGGATCCGGGGTTGAATCAAA	sense	2326–2350	63
BamHI fw II	AAACACTTCC			
DENV-3 NS1	ACTCGAGTGCTGAGACTAAAGAC	antisense	3447–3469	59
XhoI rev	TTTACCA			
DENV-4 NS1	CGGGATCCGGACACGGGGTTGTG	sense	2423–2441	64
BamHI fw	CGGTG			
DENV-4 NS1	GGGGTACCGGCCGATACCTGTGA	antisense	3458–3480	64
KpnI rev	TTTGACC			
DENV-4 NS1	CGGGATCCGGGCACGAACTCAA	sense	2336–2356	63
BamHI fw II	GGAACAC			
DENV-4 NS1	ACTCGAGGGCCGTCACCTGTGAT	antisense	3461–3479	60
XhoI rev	TTG			
JEV E fw	AAGGAGACAGCTGCTTGACA	sense	1054–1073	60
JEV E rev	AGAACACGAGCACACCTCT	antisense	2438–2457	58
Mykoplasma GPO-3	GGGAGCAAACAGGATTAGATAC CCT	sense	abhängig von Stamm	66
Mykoplasma MGSO	TGCACCATCTGCTACTCTGTAAAC CTC	antisense	abhängig von Stamm	68
TOSV F1	ACACAAAGACCTCCCGTATTG	sense	1–21	60
TOSV R1	GAAATCTGAGGGGTGGGATC	antisense	1006–1025	60
TOSV F2	TTCTATCTGACAAACGATGCCTT	sense	925–947	59
TOSV R2	ACACAGAGATTCCCGTGTATTAA AC	antisense	1845–1869	63
SFSV F1	CTGATCACACACATGATGAACAG	sense	1–23	61
SFSV R1	GAGTAAGCTGCTGCTAGTGTGG	antisense	929–950	64
SFSV F2	AAACCGAATCCACCCTTG	sense	850–867	54
SFSV R2	CACAAAGGTCCCTAGTTAATCTG AG	antisense	1701–1725	64
SFNV F1	TGCGAAAAGATAAAGTCTAGACA AG	sense	1–25	61
SFNV R1	AGGGTGAATAATTGGTCATTGAT T	antisense	977–1000	58
SFNV F2	AAGGACAAGCCCTGCAGC	sense	900–917	58
SFNV R2	ACACAAAGAATCCCGTTATTTAAC T	antisense	1801–1825	59
CYPV F1	CACATGATGAACAGCCAGTACA	sense	1–22	60
CYPV R1	TAAGCTGCTGCTAATGTGGG	antisense	931–950	58
CYPV F2	CCAGACCCTACCCACCCT	sense	850–867	61
CYPV R2	ACACAAAGTTCCCTAGTTAATCTG AGT	antisense	1703–1729	64
RVFV F1	ACACAAAGACCCCTAGTGC	sense	1–20	60
RVFV R1	CCGTCAGGCTTACAAGACA	antisense	924–943	60
RVFV F2	TGATGGATTTGTTGAGGTTGA	sense	808–828	55
RVFV R2	CACAAAGCTCCCTAGAGATACA	antisense	1666–1689	60

Position der Primer in den Stämmen mit folgender Genebank Accessionnr.: FJ478457 (DENV-1), AF169686 (DENV-2), AY676352 (DENV-3), AF326573 (DENV-4), FJ185037 (JEV), X53794 (TOSV), EF201822 (SFSV), EF201829 (SFNV), GU119908 (CYPV), EU312137 (RVFV).

2.1.4.3 Vektoren und Vektor-Gen-Konstrukte

Name	Hersteller
pDrive Cloning Vector	QIAGEN GmbH, Hilden
pTriEx-3	Merck KGaA, Darmstadt, Germany



Vektor-Gen-Konstrukte

Name	Vektor	Insert	Bezugsquelle
P778 (pCAGGC-GPC[CCHFV])	pCAGGC	GPC-Protein des CCHFV-Stammes IbAr10200 (Nigeria)	Ramon Flick, BioProtection Systems Corporation, Iowa, USA
P779 (pCMV-N[CCHFV])	pcDNA	N-Protein des CCHFV-Stammes IbAr10200 (Nigeria)	Ramon Flick, BioProtection Systems Corporation, Iowa, USA
pDrive-DEN-1 NS1	pDrive	DEN-1 NS1	-
pDrive-DEN-2 NS1	pDrive	DEN-2 NS1	-
pDrive-DEN-3 NS1	pDrive	DEN-3 NS1	-
pDrive-DEN-4 NS1	pDrive	DEN-4 NS1	-
pTriEx-1-CCHFV-N	pTriEx-1	N-Protein des CCHFV-Stammes IbAr10200 (Nigeria)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
pTriEx-1-CCHFV-G _N	pTriEx-1	G _N -Protein des CCHFV-Stammes IbAr10200 (Nigeria)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
pTriEx-1-CCHFV-G _C	pTriEx-1	G _C -Protein des CCHFV-Stammes IbAr10200 (Nigeria)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
pTriEx-3-DEN-1 NS1	pTriEx-3	DEN-1 NS1	-
pTriEx-3-DEN-2 NS1	pTriEx-3	DEN-2 NS1	-
pTriEx-3-DEN-3 NS1	pTriEx-3	DEN-3 NS1	-
pTriEx-3-DEN-4 NS1	pTriEx-3	DEN-4 NS1	-
pTriEx-3-DEN-1 NS1 SS	pTriEx-3	DEN-1 NS1	-
pTriEx-3-DEN-2 NS1 SS	pTriEx-3	DEN-2 NS1	-
pTriEx-3-DEN-3 NS1 SS	pTriEx-3	DEN-3 NS1	-
pTriEx-3-DEN-4 NS1 SS	pTriEx-3	DEN-4 NS1	-

Alle Vektor-Gen-Konstrukte wurden mit Vektor-basierten Primern (M13 fw und M13 rev bzw. pTriEx-3 up und pTriEx-3 down) in beide Richtungen sequenziert.

2.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper

Name	Zielantigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-(His) ₆ -Tag	(His) ₆ -Tag	Maus	1:100	Dianova mbH, Hamburg
anti-NS1 (monoklonal)	DENV NS1	Maus	1:100 (WB) 1:20 (IIFT)	Abcam plc, Cambridge, UK

Sekundäre Antikörper

Name	Enzym	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-Human IgG	FITC	Ziege	gebrauchsfertig	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
anti-Human IgM	FITC	Ziege	gebrauchsfertig	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
anti-Human IgG mit Evans-Blau	FITC	Ziege	gebrauchsfertig	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
anti-Human IgM mit Evans-Blau	FITC	Ziege	gebrauchsfertig	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
anti-Maus IgG (H+L)	FITC	Ziege	1:200	Dianova mbH, Hamburg
anti-Maus IgG	HRP	Ziege	1:8000	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

2.1.6 Zelllinien, Viren, Bakterien

2.1.6.1 Zelllinien

Name	Gewebe	Organismus	Quelle (Zugangsnr.)
COS-7	Niere	Affe (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	ATCC (CRL-1651)
HEK 293 Graham	fötale Niere	Mensch	Robert Koch-Institut, Berlin
HEK 293 ^{RKI}	fötale Niere	Mensch	Robert Koch-Institut, Berlin
HeLa	Zervix	Mensch	ATCC (CCL-2)
Vero E6	Niere	Affe (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	ATCC (CLR-1586)

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert

2.1.6.2 Viren

Name	Stamm	Genbank-Zugangsnr.	Quelle
Chikungunya-Virus	CHIKV Stamm LR2006-OPY1	DO443544	Remi Charrel, Université de la Méditerranée, Marseille, Frankreich
Dengue-Virus Serotyp 1	-	-	ATCC
Dengue-Virus Serotyp 2	-	-	ATCC
Dengue-Virus Serotyp 3	-	-	ATCC
Dengue-Virus Serotyp 4	-	-	Institut Pasteur, Lyon, Frankreich
Japanisches Enzephalitis-Virus	-	-	ATCC
Riftalfieber-Virus	-	-	Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg
Sandfliegen-Fieber-Virus (Typ Cyprus)	-	-	Ana Papa, Aristotle University of Thessaloniki, Griechenland

Sandfliegen-Fieber-Virus (Typ Naples)	-	-	Loredana Nicoletti, Istituto Superiore di Sanita, Rom, Italien
Sandfliegen-Fieber-Virus (Typ Sicillian)	-	-	Loredana Nicoletti, Istituto Superiore di Sanita, Rom, Italien
Sandfliegen-Fieber-Virus (Typ Toscana)	-	-	Loredana Nicoletti, Istituto Superiore di Sanita, Rom, Italien

2.1.6.3 Bakterien

Name	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> One Shot [®] Top10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ/ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.7 Software

Software	Quelle
BLAST 2.2.22	NCBI, Bethesda, USA
Endnote X	Thomson ISI ResearchSoft, Berkeley, USA
EUROPicture 1.4.2	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Lasergene 8 Programmpaket	DNASStar Inc., Madison, WI USA
MEGA 4.1 und 5	Center for Evolutionary Functional Genomics, Tempe, AZ, USA
OligoAnalyzer 3.1	Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, USA
Primer3Plus Release 1.0.0	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, UK

2.1.8 Humane Probenkollektive zur IIFT-Evaluierung

2.1.8.1 Probenkollektive für die anti-CHIKV IIFT-Evaluierung

Zur Evaluierung des anti-CHIKV IIFTs wurden vier verschiedene Proben-Panels von CHIKV-infizierten Patienten mit dem anti-CHIKV IIFT untersucht.

CHIKV-Panel 1 bestand aus 81 anti-CHIKV IgM-positiven, 19 IgM-negativen, sowie 40 IgG-positiven und 60 IgG-negativen Patientenseren, die im Jahre 2005 während des CHIK-Ausbruchs auf der Insel La Réunion abgenommen wurden. Sie wurden zweimal im Abstand von zwei Jahren im Institut Pasteur in Lyon, Frankreich mit dem gleichen *in-house* IgM-capture- und indirektem IgG-ELISA (siehe Kap. 2.2.2.2) getestet. Nur die Werte des zeitgleich durchgeführten ELISAs wurden für die IIFT-Evaluierung verwendet.

Das CHIKV-Panel 2 waren 50 anti-CHIKV IgM-positiv und 47 IgG-positiv Seren, die im Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg mit einem *in-house* IIFT analysiert wurden. Diese Patienten erlangten ihre CHIKV-Infektion während ihrer Reise in Gebiete des Indischen Ozeans [57].

Zwei verschiedene Panels dienten als Negativkontrolle für die Evaluierung des anti-CHIKV IIFTs. CHIKV-Panel 3 bestand aus hundert Seren von deutschen Blutspendern, die keinem bekannten CHIKV-Infektionsrisiko ausgesetzt waren und CHIKV-Panel 4 waren 15 anti-

DENV IgM-positive und 20 anti-DENV IgG-positive Seren von infizierten Patienten aus Saudi-Arabien und infizierten, nach Deutschland zurückgekehrten Reisenden.

2.1.8.2 Probenkollektive für die anti-JEV IIFT-Evaluierung

Für die Evaluierung des anti-JEV IIFTs wurde ein Serum-Panel (JEV-Panel 1) verwendet, das aus einer kontrollierten, randomisierten JE-Impfstudie stammte, die von der Intercell Biomedical Ltd., Livingston, Großbritannien durchgeführt wurde. Die Details des Studiendesigns sind den folgenden Publikationen zu entnehmen [72,181,182].

Die verwendeten Seren stammten von 100 Personen, die mit dem neuen JE-Impfstoff IC51 (IXIARO[®]) am Tag 0 und Tag 28 geimpft wurden. Die Seren wurden an fünf verschiedenen Zeitpunkten entnommen: Tag 0 (V0), Tag 7 (V2), Tag 28 (V3), Tag 35 (V4) und Tag 56 (V5). Insgesamt wurden für die Studie 300 verschiedene Seren untersucht, die alle mit einem 50 % Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT50) vorcharakterisiert waren.

Für die IgM-Test-Evaluierung wurden 78 Seren der Zeitpunkte V2, V3, V4 und V5 von insgesamt 49 Geimpften mit dem EUROIMMUN anti-JEV IgM-IIFT, dem Panbio Japanese Encephalitis - Dengue IgM Combo ELISA (siehe Kap. 2.2.2.3.3) und mit dem InBios JE Detect[™] IgM-*capture* ELISA (siehe Kap. 2.2.2.3.4) analysiert.

Für die anti-JEV IgG-IIFT Evaluierung wurden die Proben vom Zeitpunkt V5 (n = 100) mit dem EUROIMMUN anti-JEV IgG-IIFT und mit dem InBio JE Detect[™] IgG-ELISA (siehe Kap. 2.2.2.3.5) untersucht.

Als Negativkontrolle für den anti-JEV IgM- und IgG-IIFT dienten die entsprechenden Seren der Geimpften vom Zeitpunkt V0 (IgM n = 49, IgG n = 100). Für den IgM-IIFT wurden zusätzlich 29 weitere, PRNT50-negative Seren als Negativkontrollen verwendet.

Das JEV-Panel 2 aus 20 anti-JEV IgG-positiven Seren vom Zeitpunkt V5 und 10 anti-JEV IgM-positiven Seren der Zeitpunkte V3 und V4, wurde mit dem Flavivirus Profil 2 (siehe Kap. 2.2.2.3.2) untersucht, um herauszufinden wie stark die humorale Kreuzreaktivität von anti-JEV-positiven Seren mit anderen flaviviralen Substraten im IIFT ist.

Das JEV-Panel 3 diente der Bestimmung der Kreuzreaktivität von anti-DENV-positiven Seren in den JEV-Testen. Dazu wurden 15 anti-DENV IgM-positive Seren mit dem EUROIMMUN Flavivirus Profil 2 und zehn anti-DENV IgM-positive Seren mit dem Panbio und InBios IgM-ELISA getestet. Zudem wurden 20 anti-DENV IgG-positive Seren mit dem EUROIMMUN Flavivirus Profil 2 und dem InBios IgG-ELISA untersucht.

Zur Bestimmung der JEV-Antikörperprävalenz in der deutschen Bevölkerung wurden zusätzlich von der EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG zweihundert Seren von norddeutschen Blutspendern mit dem IIFT auf anti-JEV IgM- und 197 Seren auf anti-JEV IgG-Antikörper getestet (JEV-Panel 4).

Der Verlauf der IgM- und IgG-Antwort wurde in allen Impfungen untersucht. Dazu wurden alle PRNT50-positiven und ausgewählte PRNT50-negative Seren im IgM- und IgG-IIFT getestet. Sechs beispielhafte Verläufe wurden ausgewählt und verwendet um die Daten in dieser Studie zu präsentieren.

2.1.8.3 Probenkollektiv für die anti-DENV Mosaik IIFT-Austestung

Das DENV-Panel 1 bestand aus 12 spanischen Reiserückkehrern. Die Seren wurden von Cristina Domingo-Carrasco untersucht und die entsprechenden DENV-Stämme per PCR serotypisiert. Die Seren wurden in beiden anti-DENV Mosaik IIFTs analysiert.

Das DENV-Panel 2 bestand aus 57 Seren, die von Isabelle Schuffenecker im Institut Pasteur in Lyon untersucht worden sind. Sie stammten von französischen Reiserückkehrern und Einwohnern der französischen Überseegebiete. 16 dieser Seren, mit vorliegenden DENV-PCR-Ergebnissen, wurden im ebenfalls in beiden anti-DENV Mosaik IIFTs getestet.

2.1.8.4 Probenkollektive für die anti-SFV Mosaik IIFT-Evaluierung

Das Panel aus 132 Seren stammte von türkischen Blutspendern, die innerhalb einer Studie von Koray Ergunay an der Hacettepe University, Ankara, Türkei mit dem anti-SFV IgG-IIFT getestet wurden.

Die Seren wurden im Anschluss auf ihre Reaktivität im Enzywell Toscana Virus IgG/IgM-ELISA (Firma DIESSE, siehe Kap. 2.2.2.5.2) und im recomLine IgM/IgG Blot (Firma Mikrogen, siehe Kap. 2.2.2.5.3) analysiert.

2.1.8.5 Probenkollektive für die anti-RVFPV IIFT-Evaluierung

Die Evaluierung des anti-RVFPV IIFTs wurde mit 39 Seren von RVFPV-Infizierten aus Saudi-Arabien durchgeführt. Die Proben wurden im Anschluss in Südafrika im National Institute for Communicable Diseases in Sandringham mit einem etablierten, anti-RVFPV *in-house* ELISA (siehe Kap. 2.2.2.6.2) getestet.

Das RVFPV-Panel 2 bestand aus deutschen Blutspendern und diente als Negativpanel. Die Seren wurden von der EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG im anti-RVFPV IgM-IIFT (n = 180) und IgG-IIFT (n = 200) getestet.

2.1.8.6 Probenkollektive für die anti-CCHFV IIFT-Evaluierung

Für die Evaluierung des rekombinanten anti-CCHFV IIFTs wurden fünf verschiedene Proben-Panels mit dem anti-CCHFV IIFT untersucht.

Das CCHFV-Panel 1 stammte aus dem Institut für Mikrobiologie and Immunologie der Universität Ljubljana, Slowenien. Es handelte sich um 70 IgM-positive und 34 IgM-negative, sowie 54 IgG-positive und 39 IgG-negative Seren von CCHFV-Patienten aus dem Kosovo, die mit dem IgM- und IgG-ELISA (siehe Kap. 2.2.2.7.2.1) charakterisiert worden sind.

Das CCHFV-Kollektiv 2 waren 18 IgM-positive und 52 IgG-positive Seren aus dem Iran, die mit dem *in-house* IgM-capture- und dem IgG-ELISA (siehe Kap. 2.2.2.7.2.2) im Institut Pasteur in Teheran untersucht wurden.

Das CCHFV-Panel 3 bestand aus 65 Seren von CCHFV infizierten Patienten, die im virologischen Referenz- und Forschungslabor der Refik Saydam National Public Health Agency in Ankara, Türkei untersucht wurden. 60 Seren wurden mit einem IgM-ELISA (siehe Kap. 2.2.2.7.2.3) getestet und 5 Seren mit einem IgG-ELISA. Alle Proben wurden zudem in einer CCHFV-PCR untersucht.

Das CCHFV-Panel 4 bestand aus 14 IgM-positiven und 4 IgM-negativen, sowie 13 IgG-positiven und 5 IgG-negativen Seren von CCHFV-Infizierten aus Südafrika. Die Seren wurden im National Institute for Communicable Diseases in Sandringham, Südafrika auf anti-CCHFV Antikörper mittels IgM- und IgG-ELISA (siehe Kap. 2.2.2.7.2.4) getestet.

Das CCHFV-Panel 5 waren 45 deutsche Blutspender, die als Negativpanel dienten. Ihre Seren wurden sowohl von der EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG im anti-CCHFV IgM- und IgG-IIFT getestet als auch im Institut für Mikrobiologie and Immunologie der Universität Ljubljana in Ljubljana, Slowenien mit dem IgM- und IgG-ELISA (siehe Kap. 2.2.2.7.2.1) untersucht.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Virusanzucht

2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden mit Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) bzw. Modified Eagles Medium (MEM) kultiviert (siehe Kap. 2.1.6.1).

Das Auftauen der Zellen erfolgte, zur Vermeidung von zellschädigender Eiskristallbildung unter warmem Wasser. Darauf wurden die Zellen unverzüglich in 10 mL Medium gegeben und für 10 min bei 1100 * g zentrifugiert, um das zelltoxische DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in Medium resuspendiert, zur Kultivierung in eine Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂.

Zur Passagierung der Zellen bei konfluentem Zellrasen wurde zunächst das Medium abgegossen und mit 0,9 %igem NaCl oder Diluent gespült, um die Reste des Mediums zu entfernen und die Zellen anzulösen. Dann wurden pro 75 cm²-Flasche 3 mL 1:7 verdünntes 10 x Trypsin auf die Zellen gegeben und die Zellen für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 10 ml Medium vom Boden abgespült und 3 min bei 1100 * g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium aufgenommen und mehrfach resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. Schließlich wurden sie in einer

geeigneten Verdünnung in eine Zellkulturflasche eingesät und diese mit einer entsprechenden Menge Medium aufgefüllt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Je nach Bedarf wurden die Zellen verdünnt, eingefüllt und dann die vier Großquadrate ausgezählt.

Die Berechnung der Zellzahl je mL erfolgte nach folgender Formel:

$$[\text{Gesamtzellzahl} / 4] * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 = \text{Zellzahl} / \text{mL}$$

Zum Einfrieren wurden die Zellen für 10 min bei 1100 * g pelletiert und dann in 5 mL Einfriermedium (10 % DMSO, 90 % FKS) aufgenommen und in Aliquots von 1 mL abgefüllt.

Die Aliquots wurden zunächst bei -80 °C eingefroren und nach einer Woche in flüssigen Stickstoff überführt.

Alle Zellen wurden in regelmäßigen Abständen sowie vor dem Einfrieren hinsichtlich einer möglichen Mykoplasmen-Kontamination mittels PCR untersucht (siehe Kap. 2.2.4.5).

2.2.1.2 Viruskultivierung

Zur Herstellung eines Vorrats an infektiösem Virus, wurden die abtrypsinisierten Zellen, sofern die Virusmenge zuvor bekannt war, mit einer Infektionsdosis (MOI = *multiplicity of infection*) von 0,1 infiziert. Die infizierten Zellen wurden dann in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Überprüfung der Infektion wurden zusätzlich Objektträger mit der Zell-Virus-Lösung beimpft und in regelmäßigen Abständen per lichtmikroskopischer Kontrolle und in der Immunofluoreszenz (siehe Kap. 2.2.1.3) beurteilt, um den besten Zeitpunkt für die Virusernte (80 - 100 % infizierte Zellen) zu ermitteln.

Die Virusernte wurde durchgeführt, indem zunächst alle Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und dann bei 4000 * g für 10 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.3 Immunfluoreszenz zur Kontrolle der Infektionsrate

Parallel zur Infektion in Zellkulturflaschen oder auf Deckgläsern, wurden die infizierten Zellen auf Objektträgern kultiviert, um den Fortgang der Infektion monitoren zu können. Dazu wurde jeweils ein Objektträger mit PBS und einer speziellen Schutzlösung abgespült und dann mit Aceton fixiert und luftgetrocknet. Der Objektträger wurde mittels der TITERPLANE™-Technik auf einer Reaktionsschablone inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit dem primären und sekundären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (siehe Kap. 2.1.5) für jeweils 30 min. Für die Waschschriffe nach beiden Inkubationen wurde PBS/0,2 % Tween 20 verwendet. Dazu wurde der Objektträger einmal abgespült und dann für 5 min im Waschpuffer inkubiert. Der Objektträger wurde schließlich mit dem EUROIMMUN-Eindeckmedium eingedeckt und mit dem EUROSTAR II Mikroskop begutachtet.

2.2.1.4 Herstellung der Deckgläser für die EUROIMMUN Immunfluoreszenzteste

Die Deckgläser für Produktion der BIOCHIPs wurden im Robert Koch-Institut hergestellt. Dazu wurden die Vero E6-Zellen, infiziert mit den verschiedenen Viren, auf Deckgläsern kultiviert. Je nach Virus wurde die Infektion vor dem Einsäen der Zellen oder danach durchgeführt. Zur Überprüfung der Infektion wurden zusätzlich Objektträger mit der Zell-Virus-Lösung beimpft und in regelmäßigen Abständen per lichtmikroskopischer Kontrolle und in der Immunofluoreszenz (siehe Kap. 2.2.2.1) beurteilt. Wenn die Zellen zu ca. 50 % infiziert waren, wurden die Deckgläser mit PBS abgespült, mit Schutzlösung behandelt und anschließend mit Aceton fixiert.

Die Aceton-fixierten, infizierten Zellen auf den Deckgläsern wurden zusätzlich vor der Weiterbehandlung bei der EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck durch γ -Bestrahlung inaktiviert. Die γ -Bestrahlung wurde durch die Firma Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH, Radeberg durchgeführt, dafür wurden die Proben mit einer Dosis von 30 kGy bestrahlt. Als Strahlenquelle diente Kobalt-60.

Die Produktion der CCHFV- und DENV NS1-Deckgläser wurde wie unter (siehe Kap. 2.2.4.19) beschrieben, durchgeführt.

2.2.2 Immunodetektionsassays

2.2.2.1 EUROIMMUN Immunfluoreszenzteste

Die IFTs wurden bei der EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck aus den, wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben hergestellten, Deckgläsern produziert. Dazu wurden die Deckgläser maschinell in Millimeter-große BIOCHIPs zerteilt und dann auf Objektträger aufgebracht [29]. Das kleine Format der BIOCHIPs macht es möglich in einem Reaktionsfeld von 5 x 5 mm bis zu 9 verschiedene BIOCHIPs (jeweils 1 x 1 mm) mit unterschiedlichen Substraten aufzubringen, z.B. pro Reaktionsfeld einen BIOCHIP mit virusinfizierten und einen BIOCHIP mit nicht infizierten Zellen.

IFTs, die in einem Reaktionsfeld verschiedene BIOCHIPs mit Serotypen oder Proteinen eines Erregers enthalten, werden als Mosaik bezeichnet, während IFTs, die in einem oder mehreren Reaktionsfeldern BIOCHIPs verschiedener Erreger zur Differentialdiagnose enthalten, als Profile bezeichnet werden.

Vor der Durchführung der IgM-Detektion wurden IgG-Antikörper und Rheumafaktoren mittels des EUROSORB-Reagenz absorbiert. Dazu wurde das Serum 1:10 in EUROSORB verdünnt und nach einer 15minütigen Inkubation für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Für die IgM-Bestimmung auf den Flavivirus-Substraten, wurde das EUROSORB-Reagenz

und der EUROIMMUN-Probenverdünnungspuffer vor Gebrauch mit 2 % Tween 20 versetzt.

Die Proben wurden in der Regel in einer 10er Verdünnungsreihe von 1:10 - 1:1000 mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt und 25 µL der Verdünnungen wurden auf die Reaktionsfelder des Reagenzträgers pipettiert. Der Objektträger wurde dann in die Aussparungen des Reagenzträgers gelegt, so dass alle BIOCHIPS mit den Serumverdünnungen in Kontakt kamen. Die Inkubation mittels dieser TITERPLANE™ Methode hat den Vorteil, dass die Inkubation aller BIOCHIPS eines Reaktionsfeldes simultan mit der gleichen Serumverdünnung unter den gleichen Bedingungen stattfindet. Zudem entfällt die Notwendigkeit einer feuchten Kammer.

Nach einer 30minütigen Inkubation der Serumverdünnungen wurde der Objektträger zunächst mit dem IIFT-Waschpuffer aus PBS/0,2 % Tween 20 kurz abgespült und dann für 5 min im Waschpuffer inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der gebrauchsfertige, sekundäre, FITC-gekoppelte Antikörper auf einen Reaktionsträger pipettiert (20 µL je Reaktionsfeld). Der Objektträger wurde danach kurz auf der Rückseite und den Kanten abgewischt und dann wie zuvor auf den Reagenzträger gelegt und für 30 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde der Objektträger erneut auf der Rückseite und den Kanten abgewischt und eingedeckt. Die Fluoreszenz wurde im Anschluss unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 200facher Vergrößerung und 450 – 490 nm-Anregungsbandpass- und 515 nm-Langpasssperrfilter nach der EUROIMMUN Standardprozedur beurteilt. Laut dieser Prozedur wird die Fluoreszenzstärke mit 1 – 5 bewertet und beispielsweise steht eine 1:10 Verdünnung mit einer Stärke 1 für einen Titer von 1:10, bei einer Stärke 2 liegt der Titer bei 1:32 und bei der Stärke 3 bei 1:100. Eine Fluoreszenzstärke von 4 oder mehr bedeutet einen Titer > 1:100.

2.2.2.2 Bestimmung von Antikörpern gegen das Chikungunya-Virus

2.2.2.2.1 EUROIMMUN anti-CHIKV IIFT

Für den anti-CHIKV IIFT wurde der CHIKV Stamm LR2006-OPY1 (Genebank Zugangsnr. DQ443544) aus La Réunion verwendet. Jedes Reaktionsfeld des anti-CHIKV IIFTs ist mit zwei BIOCHIPS bestückt, einen mit infizierten und einen mit nicht infizierten Vero E6-Zellen. Der IIFT wurde mit allen CHIKV-Panels (siehe Kap. 2.1.8.1) getestet. Die Seren wurden 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und der IIFT wurde durchgeführt wie unter (siehe Kap. 2.2.2.1) beschrieben.

Ein Titer von $\geq 1:10$ im anti-CHIKV IgM- und IgG-IIFT wurde als positiv gewertet.

2.2.2.2.2 *In-house anti-CHIKV IgM-capture und IgG-ELISA*

Die *in-house* anti-CHIKV ELISAs wurden in am Institut Pasteur in Lyon, Frankreich hergestellt und von Isabelle Schuffenecker und Hervé Zeller zur Bestimmung der IgM- und IgG-Antikörper im CHIKV-Proben-Panel 1 (siehe Kap. 2.1.8.1) verwendet.

Zur Herstellung beider Assays wurde der inaktivierte CHIKV-Referenzstamm S27 (Cluster Ostafrika/Zentralafrika, Genebank Zugangsnr. AF369024) eingesetzt.

Die *IgM-capture* ELISA-Platten wurden mit einem Ziege-anti-Human IgM-Antikörper (Sigma-Aldrich, München) beschichtet. Der Antikörper wurde 1:2000 in PBS/Natriumazid verdünnt und je Vertiefung wurden 100 µL Antikörper-Verdünnung auf der Maxisorb-ELISA-Platte (Nunc, Langenselbold) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platten wurden einmal mit PBS/Tween gewaschen und dann wurden in Duplikaten je 100 µL des 1:100 verdünnten Serums aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten 4-mal mit PBS/Tween gewaschen und im Anschluss in jeweils eine Vertiefung 100 µL des 1:4 verdünnten, inaktivierten CHIKV gegeben. In die andere Vertiefung wurde das Kontrollantigen gegeben und die Platte dann für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem erneuten, 4fachen Waschschrift mit PBS/Tween, wurden 100 µL einer 1:1000 verdünnten CHIKV-hyperimmunen Aszitisflüssigkeit von der Maus in jede Vertiefung pipettiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde wie zuvor gewaschen und dann mit 100 µL Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (Sigma-Aldrich, München) in einer Verdünnung von 1:2000 pro Vertiefung für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden pro Vertiefung 100 µL Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben (KPL, Gaithersburg, MD, USA) und bei RT für 3 - 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit jeweils 100 µL 10 %iger Schwefelsäure abgestoppt und die Absorption bei 450 nm (620 nm Referenzfilter) spektrophotometrisch bestimmt.

Für den indirekten IgG-ELISA wurde die Polysorb-ELISA-Platte (Nunc, Langenselbold) mit 100 µL, 1:1000 in PBS/Natriumazid verdünntem, inaktivierten CHIKV pro Vertiefung beschichtet. Zusätzlich wurde in weitere Vertiefungen 100 µL Kontrollantigen gegeben und ebenfalls über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platten wurden am nächsten Tag einmal mit PBS/Tween gewaschen und 100 µL jeder 1:100 Serumverdünnung wurden in jeweils eine mit CHIKV und eine mit Kontrollantigen beschichtete Vertiefung gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Platte 3mal mit PBS/Tween gewaschen und danach wurde in jede Vertiefung 100 µL 1:2000 verdünntes, HRP-gekoppeltes anti-Human IgG-Konjugat (Sigma-Aldrich, München) gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden 100 µL TMB-Lösung in jede Vertiefung pipettiert und bei RT 10 min inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 100 µL 10 %iger Schwefelsäure wurde die Absorption bei 450 nm (620 nm) gemessen.

Bei beiden Bestimmungen wurde die bereinigte optische Dichte (OD) berechnet, indem der unspezifische Hintergrund in den Vertiefungen mit Kontrollantigen von den OD-Werten der Vertiefungen mit CHIKV-Antigen abgezogen wurde. Der *Cut-off* wurde berechnet durch den mittleren bereinigten OD-Wert von drei negativen Seren plus 3 Standardabweichungen. Für den IgM-*capture* ELISA lag der *Cut-off* bei 0,2 und für IgG bei 0,1. OD-Werte von Patienten über dem *Cut-off*-Wert wurden als positiv bewertet.

Beide *in-house* ELISAs wurden mit zwei Serum-Panels evaluiert. Zum einen mit 66 Seren die nicht mit CHIKV- oder DENV-infiziert waren, jedoch an einem CHIKV- oder DENV-ähnlichen Krankheitsbild oder fiebriger Meningitis litten und zum anderen mit einem Panel von 80 Seren von DENV-Infizierten.

2.2.2.2.3 *In-house* anti-CHIKV IIFT

Die anti-CHIKV *in-house* IIFTs wurden am Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg hergestellt und dort von Christian Drosten und Petra Emmerich zur anti-CHIKV IgM- und IgG-Bestimmung im CHIKV-Proben-Panel 2 (siehe Kap. 2.1.8.1) genutzt.

Zur Herstellung des *in-house* IIFTs wurde ebenfalls, wie auch für die *in-house* ELISAs der CHIKV-Referenzstamm S27 verwendet (Cluster Ostafrika/Zentralafrika, Genbank Zugangsnr. AF369024). Vero E6-Zellen wurden mit diesem Stamm infiziert, als Suspensionszellen auf die Objektträger ausgebracht, mit eiskaltem Aceton fixiert und im Anschluss luftgetrocknet. Serumproben wurden in verschiedenen Verdünnungen jeweils für 1 h (IgG) oder über Nacht (IgM) mit den CHIKV-infizierten Zellen inkubiert. Zur Detektion wurde anti-Human IgG oder IgM, markiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Sinfon, Berlin) verwendet. IgG wurde für die IgM-Bestimmung durch Biosorb resin (Biomed, München) absorbiert.

Der *in-house* IIFT wurde mit 120 deutschen Blutspenderseren, sowie mit 25 IgM- und IgG-positiven Seren von Dengue-Infizierten und 10 Seren von mit Ross River-infizierten Personen evaluiert.

2.2.2.3 Bestimmung von Antikörpern gegen das Japanische Enzephalitis-Virus

2.2.2.3.1 EUROIMMUN anti-JEV IIFT

Der EUROIMMUN anti-JEV IIFT wurde mit je zwei BIOCHIPs pro Reaktionsfeld bestückt, einem mit JEV-infizierten und einem mit nicht infizierten Vero E6-Zellen. Das JEV Serum-Panel (siehe Kap. 2.1.8.2) wurde mit diesem anti-JEV IIFT getestet. Dazu wurden die entsprechenden Proben 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und inkubiert wie unter Kapitel 2.2.2.1 beschrieben. Alle Titer $\geq 1:10$ wurden als positiv bewertet.

2.2.2.3.2 Flavivirus Profil 2

Das Flavivirus Profil 2 besteht aus insgesamt acht verschiedenen BIOCHIPs mit Zellen, die mit unterschiedlichen Flaviviren infiziert sind. Die fünf oberen Reaktionsfelder des Objektträgers sind mit jeweils vier verschiedenen BIOCHIPs bestückt. Auf der Oberfläche der BIOCHIPs befinden sich Zellen, die infiziert sind mit Frühsommer-Meningoencephalitisvirus, mit West-Nil-Fiebervirus, mit Japanischem Encephalitis-Virus und mit Gelbfieber-Virus. In der unteren Reihe sind die fünf Reaktionsfelder ebenfalls mit vier BIOCHIPs bestückt, die mit Zellen bewachsen sind, die jeweils mit einem der vier Dengue-Serotypen infiziert sind.

Jede Serumverdünnung des JEV-Panels 2 und 3 (siehe Kap. 2.1.8.2) wurde auf diesen beiden verschiedenen Reaktionsfeldern inkubiert und, wie unter Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, evaluiert.

2.2.2.3.3 IgM-Bestimmung mittels des Panbio Japanese Encephalitis-Dengue IgM Combo ELISA

Der Panbio Japanese Encephalitis – Dengue IgM Combo ELISA ist ein *IgM-capture* ELISA, der auf rekombinanten JEV und DENV 1-4 Antigenen beruht, die in Insektenzellen exprimiert und mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper aufgereinigt werden. Komplexe beider aufgereinigter Antigene mit ihrem spezifischen monoklonalen HRP-gekoppelten Antikörper (HRP-mAK) werden im ELISA eingesetzt. Von jedem Serum werden zwei Bestimmungen durchgeführt, eine mit dem JEV/HRP-mAK-Komplex und eine mit dem DENV/HRP-mAK-Komplex. Die ELISA-Platten sind mit anti-Human IgM-Antikörpern beschichtet, die die Serum-IgM-Moleküle binden. Bei Zugabe der jeweiligen Antigen/HRP-mAK-Komplexe binden die spezifischen Serum-IgM-Moleküle diese Komplexe. Der Nachweis der gebundenen Antigen/HRP-mAK-Komplexe erfolgt mittels Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxid (TMB/H₂O₂).

Die Probenpanels, die mit dem ELISA inkubiert wurden, sind im Kapitel 2.1.8.2 beschrieben. Die Bestimmung wurde gemäß der Herstellerangaben im Handbuch (Stand 15.06.2007) durchgeführt. Panbio Units > 11 galten als positiv, < 9 als negativ und Panbio Units zwischen 9 und 11 als grenzwertig. Aus dem Panbio Units konnte eine JE/DEN Ratio berechnet werden, um zu bestimmen, ob der Patient Antikörper gegen JEV oder DENV besaß. Bei einer Ratio ≥ 1 handelte es sich wahrscheinlich um eine JEV-Infektion, bei einer Ratio von < 1 war es wahrscheinlich eine DENV-Infektion.

2.2.2.3.4 IgM-Bestimmung mittels des InBios JE Detect™ IgM-capture ELISA

Der InBios JE Detect™ IgM-capture ELISA beruht auf der Verwendung des rekombinanten Antigens (JERA), das aus verschiedenen, antigenen Teilen des JEV besteht [183,184,185,186].

Die ELISA-Platten sind mit Ziege-anti-Human IgM-Antikörpern beschichtet, die Serum-IgM-Antikörper binden. Die gebundenen IgM-Antikörper der unbekannteren Seren, sowie der Negativ- und Positivkontrollen werden dann im nächsten Schritt in jeweils zwei verschiedenen Vertiefungen zum einen mit dem JERA und zum anderen mit einem normalen Zellantigen (NCA) inkubiert. Der Nachweis erfolgt über einen HRP-gekoppelten JERA-spezifischen Antikörper und über das Substrat TMB. Die Absorption des umgesetzten Farbstoffes wird photometrisch bestimmt und ist proportional zu den in der Probe vorhandenen IgM-Antikörpern.

Die Probenpanels, die mit dem ELISA inkubiert wurden, sind im Kapitel 2.1.8.2 beschrieben. Die Bestimmung und die Berechnung der ISR wurde gemäß der Herstellerangaben im Handbuch durchgeführt. ISR-Werte < 6 galten als negativ und > 10 als positiv, während Werte zwischen 6 und 10 als grenzwertig galten.

2.2.2.3.5 IgG-Bestimmung mittels des InBios JE Detect™ IgG-ELISA

Für den InBios JE Detect™ IgG-ELISA wird das gleiche rekombinante Antigen, JERA, verwendet wie für den InBios IgM-capture ELISA (siehe Kap. 2.2.2.3.4). Das JERA wie auch das normale Zellantigen (NCA) liegen jeweils über einen monoklonalen Antikörper auf der Oberfläche der ELISA-Platte fixiert vor. Die spezifischen IgG-Antikörper in den Proben können das JERA binden und werden durch die Bindung des Ziege-anti-Human IgG/HRP-Konjugats und die nachfolgende Enzymreaktion nachgewiesen.

Die Probenpanels, die mit dem ELISA inkubiert wurden, sind im Kapitel 2.1.8.2 beschrieben. Die Bestimmung und die Berechnung der ISR wurde gemäß der Herstellerangaben im Handbuch durchgeführt. ISR Werte < 2 galten als negativ, Werte zwischen 2 und 5 als grenzwertig und Werte > 5 als positiv.

2.2.2.3.6 Bestimmung von Antikörpern gegen das Japanische Encephalitis-Virus mittels PRNT50

Der PRNT50 wurde von der Intercell AG im Rahmen der JE-Impfstudie durchgeführt (siehe Kap. 2.1.8.2). Der Test wurde mit der modifizierten Methode nach Sukhavachana *et al.* [187] durchgeführt. Dazu wurde eine 4fach-Verdünnung des hitzeinaktivierten Serums für 1 h bei 35 °C mit 400 - 800 Plaqueauslösenden Einheiten (PFU) pro mL des JEV Stammes SA₁₄₋₁₄₋₂ inkubiert. Die Virus/Serum-Mischung wurde in Triplikaten auf Vero-Zellen

gegeben und diese mit Methylcellulose überschichtet, um die Virusausbreitung über das Medium zu verhindern. Nach einer Inkubation von 5 Tagen bei 35 °C wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Die Plaques wurden mit dem ProtoCOL HR Colony Counter, Synbiosis, Cambridge, UK gezählt. Die PRNT50-Titer, d.h. die Serum-Verdünnung, die eine 50 %ige Plaque-Reduktion im Vergleich zur Viruskontrolle ohne Serum auslöst, wurde mit einem linearen Regressionsanalysenprogramm ausgerechnet. Titer \geq 1:10 wurden als positiv gewertet.

2.2.2.4 Bestimmung von Antikörpern gegen Dengue-Viren

2.2.2.4.1 EUROIMMUN anti-DENV IIFT

Für den EUROIMMUN anti-DENV IIFT wurden die vier verschiedenen DENV-Serotypen (siehe Kap. 2.1.6.2) verwendet.

Der Test ist pro Reaktionsfeld mit je vier BIOCHIPs bestückt, jeweils mit Vero E6-Zellen bewachsen, infiziert mit je einem der vier DENV-Serotypen. Die DENV-Panel 1 und 2 (siehe Kap. 2.1.8.3) wurden mit dem anti-DENV IIFT untersucht. Die Proben wurden 1:10, 1:100 und zum Teil 1:1000 verdünnt und inkubiert wie unter (siehe Kap. 2.2.2.1) beschrieben. Alle Titer \geq 1:10 wurden in die Bestimmung des Serotyps einbezogen.

2.2.2.4.2 EUROIMMUN anti-DENV NS1 Mosaik IIFT

Für den rekombinante anti-DENV NS1 Mosaik IIFT wurden die NS1-Proteine der vier DENV-Serotypen, die auch für den anti-DENV Mosaik IIFT (siehe Kap. 2.1.6.2) verwendet wurden, mittels des pTriEx-3-Vektors in HEK 293^{RKI}-Zellen exprimiert. Der IIFT wurde hergestellt wie unter Kapitel 2.2.4.19 und 2.2.1.4 beschrieben

Es handelt sich um ein Mosaik mit fünf BIOCHIPs, davon jeweils ein BIOCHIP bewachsen mit Zellen, transfiziert mit dem NS1-Protein eines Serotyps und einem BIOCHIP mit nicht transfizierten Zellen.

Die DENV-Panel 1 und 2 (siehe Kap. 2.1.8.3) wurden mit dem anti-DENV NS1 Mosaik IIFT untersucht. Die Proben wurden 1:10 und 1:100 verdünnt und inkubiert wie unter Kapitel 2.2.2.1 beschrieben. Alle Titer \geq 1:10 wurden in die Bestimmung des Serotyps einbezogen.

2.2.2.4.3 Omega Diagnostics Pathozyme Dengue G zur IgG-Aviditätsbestimmung

Der Pathozyme Dengue G ELISA verwendet als Substrat das aufgereinigte DENV-2, an das ebenfalls die kreuzreaktiven Antikörper, die gegen andere DENV-Serotypen gerichtet sind, binden.

Das DENV-Panel 2 wurde mit diesem ELISA analysiert (siehe Kap. 2.1.8.3). Die Bestimmung wurde grundsätzlich gemäß der Herstellerangaben im Handbuch (Stand 04/2006) durchgeführt. Für die Aviditätsbestimmung wurde folgende Änderung vorgenommen: Jede verdünnte Probe wurde in zwei Vertiefungen pipettiert, inkubiert und gewaschen. Im Anschluss wurde eine der beiden Vertiefungen jeder Probe für 10 min bei RT mit 8 mol/L Harnstofflösung inkubiert, um die niedrig-aviden IgG-Antikörper abzulösen. Die Ergebnisse wurden zunächst mittels der Kontrolle normiert, indem der Quotient aus der OD der Probe und der OD der Positivkontrolle (low positive) gebildet wurde. Ein Wert < 1 bedeutete ein negatives und ein Wert ≥ 1 ein positives Ergebnis. Wobei ein Wert $\geq 1 \leq 2$ auf eine primäre Infektion hindeutete, ein Wert > 2 auf eine sekundäre Infektion. Zur Bestimmung der IgG-Avidität, wurde ein weiterer Quotient gebildet und zwar aus dem normierten Wert der Harnstoff-behandelten und der unbehandelten Probe. Der cut-off für die Diagnose von niedrig-aviden IgG-Antikörpern (und demnach einer Primärinfektion) lag bei 0,5. Alle Werte darüber bedeuteten das Vorliegen von hoch-aviden IgG-Antikörpern. Diese Methode wurde durch Domingo et al. [111] beschrieben.

2.2.2.5 Bestimmung von Antikörpern gegen Sandfliegen-Fieber-Viren

2.2.2.5.1 EUROIMMUN anti-SFV IIFT

Für den EUROIMMUN anti-SFV IIFT wurde je ein Stamm des TOS-, des SFN-, des CYP- und des SFS-Virus verwendet. Der Test ist pro Reaktionsfeld mit je vier BIOCHIPs bestückt, jeweils mit Vero E6-Zellen, infiziert mit je einem der vier verwendeten Sandfliegen-Fieber-Virusstämme.

Die Seren der SFV-Panel (siehe Kap. 2.1.8.4) wurden 1:100 verdünnt und inkubiert wie unter Kapitel 2.2.2.1 beschrieben. Alle Titer $\geq 1:100$ wurden als positiv bewertet.

2.2.2.5.2 DIESSE Enzywell Toscanavirus ELISA

Das virale Nukleoprotein stellt das Hauptantigen der anti-Toscanavirus Antikörper dar. Der Enzywell Toscana Virus ELISA beruht auf der Verwendung des rekombinanten Nukleoproteins, exprimiert in *E.coli*. Der Nachweis der spezifischen IgM-Antikörper geschieht in einem IgM-capture Format. Das Antigen wird für den IgM-Test in Form eines Komplexes aus biotinyliertem, aufgereinigtem Toscanavirus Nukleoprotein und dem Steptavidin-HRP-Konjugat eingesetzt. Die IgG-ELISA-Platten sind gebrauchsfertig mit dem aufgereinigten Toscanavirus Nukleoprotein beschichtet.

Die SFV-Panel (siehe Kap. 2.1.8.4) wurden mit diesem ELISA untersucht. Die Bestimmung wurde gemäß der Herstellerangaben im Handbuch (Stand 19.09.2008) durchgeführt. Eine Ratio $< 0,8$ wurde als negativ, $0,8 - 1,2$ als grenzwertig und eine Ratio $> 1,2$ wurde als positiv gewertet.

2.2.2.5.3 Mikrogen recomLine Bunyavirus IgG/IgM

Der Mikrogen recomLine Blot verwendet ebenfalls ein rekombinant hergestelltes TOSV-Nukleoprotein. Dieses wird auf einer Nitrozellulose-Membran fixiert geliefert. Der Nachweis der gebundenen Serum-Antikörper geschieht mit HRP-gekoppeltem anti-Human IgM und IgG. Die gebundene Peroxidase katalysiert eine Färbereaktion, die auf Höhe der Antigenbande sichtbar wird.

Die SFV-Panel (siehe Kap. 2.1.8.4) wurden mit diesem Blot untersucht. Die Bestimmung wurde gemäß der Herstellerangaben im Handbuch (Stand 07/2007) durchgeführt. Eine TOSV-Bande, die der Stärke der *Cutoff*-Bande entsprach, wurde als positiv gewertet. Eine Bande mit der gleichen Stärke wie die *Cutoff*-Bande hatte die Stärke 1, eine Bande die stärker gefärbt war, die Stärke 2 und eine Band mit einer sehr starken Färbung die Stärke 3.

2.2.2.6 Bestimmung von Antikörpern gegen das Riftalfieber-Virus

2.2.2.6.1 EUROIMMUN anti-RVFV IIFT

Für den EUROIMMUN anti-RVFV IIFT wurde ein nicht näher charakterisierter RVFV-Stamm vom Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg verwendet. Der IIFT ist pro Reaktionsfeld mit je zwei BIOCHIPS bestückt, einem BIOCHIP mit RVFV-infizierten und einem mit nicht infizierten Vero E6-Zellen.

Die Proben des RVFV-Panels (siehe Kap. 2.1.8.5) wurden 1:10 und 1:100 verdünnt und inkubiert wie unter Kapitel 2.2.2.1 beschrieben. Alle Titer $\geq 1:10$ wurden als positiv bewertet.

2.2.2.6.2 anti-RVFV ELISA

Die anti-RVFV ELISAs wurden im Labor von Janusz Paweska im National Institute for Communicable Diseases in Sandringham, Südafrika hergestellt und dazu verwendet das RVFV-Panel (siehe Kap. 2.1.8.5) zu untersuchen.

anti-RVFV IgM-capture ELISA

Für den IgM-capture ELISA wurden die ELISA-Platten zunächst mit dem Kaninchen-anti-Human IgM-Antikörper (1:500 in PBS) über Nacht bei 4 °C beschichtet (je 100 µL pro Vertiefung) und am nächsten Tag 3-mal mit 300 µL Waschpuffer (0,1 % Tween in PBS) gewaschen. Die Vertiefungen wurden dann mit jeweils 200 µL Blockierungspuffer (10 % Milchpulver in PBS) für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert und erneut wie oben gewaschen. 100 µL der 1:400 in Verdünnungspuffer (2 % Milchpulver in PBS) verdünnten Test- und Kontrollseren wurden dann für 1 h bei 37 °C inkubiert. Mit jedem Serum wurden zwei Vertiefungen inkubiert, eine für das RVFV-Antigen und eine für das Kontrollantigen. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die entsprechenden

Antigene zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde dann 6-mal gewaschen und jeweils 100 µL Maus-anti-RVFV Serum (1:2000 verdünnt in Verdünnungspuffer) für 1 h bei 37 °C zugegeben. Nach erneutem 3maligem Waschen wurden je 100 µL HRP-konjugiertes anti-Maus IgG (1:6000 in Verdünnungspuffer) in die Vertiefungen pipettiert und wiederum für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach 6maligem Waschen wurden 100 µL ABTS (KPL, Gaithersburg, MD, USA) zupipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µL einer 1 %igen SDS-Stopplösung gestoppt und bei 405 nm gemessen.

Die bereinigte optische Dichte wurde zunächst bestimmt, indem die OD der Antigen-Kontrolle von der OD des RVFV Antigens abgezogen wurde. Wenn die bereinigten OD-Werte der hochpositiven Kontrolle innerhalb des Bereichs 0,8 - 1,85 lagen, wurde der Mittelwert beider bereinigter OD-Werte ermittelt und damit der Prozentsatz der Positivität (PP) errechnet:

$PP = \text{bereinigte OD Serum} / \text{mittlere bereinigte OD der hochpositiven Kontrolle} * 100$

Der IgM-ELISA *cut-off* lag bei einem PP-Wert von $\geq 7,1$ und der Variationskoeffizient von einer Doppelbestimmung sollte nicht $> 15\%$ sein.

anti-RVFV IgG-ELISA

Der IgG-ELISA wurde wie folgt durchgeführt. Die Platten wurden mit 100 µL Maus-anti-RVFV Serum (1:10.000 in PBS) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Platten wurden 3mal mit 300 µL Waschpuffer (PBS/0,1 % Tween) gewaschen und mit je 200 µL Blockierungslösung (PBS/10 % Milchpulver) für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden jeweils entweder 100 µL 1:500 in Verdünnungspuffer (PBS/2 % Milchpulver) verdünntes RVFV-Antigen oder 1:500 verdünntes Kontroll-Antigen in die Vertiefungen pipettiert, so dass jede Serumverdünnung mit beiden Antigenen inkubiert werden konnte. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde die Platte wie oben gewaschen und je 100 µL des 1:400 in Verdünnungspuffer verdünnten Test- und Kontrollserums in jeweils eine Vertiefung mit dem RVFV- und dem Kontrollantigen pipettiert. Nach einer erneuten Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden die Platten 6-mal gewaschen und jeweils 100 µL HRP-gekoppeltes anti-Human IgG zugegeben, 1 h bei 37 °C inkubiert und wiederum 6-mal gewaschen. Die Entwicklung und Berechnung der OD-Werte geschah wie oben im Protokoll des IgM-*capture* ELISAs beschrieben. Die bereinigten OD-Werte der hochpositiven Kontrolle sollten bei diesem Test innerhalb des Bereichs 0,7 - 1,75 liegen und ein Serum mit einem PP-Wert von $\geq 13,21$ wurde als positiv betrachtet.

2.2.2.7 Bestimmung von Antikörpern gegen das Krim-Kongo-Hämorrhagische Fieber-Virus

2.2.2.7.1 EUROIMMUN anti-CCHFV IIFT

Der rekombinante anti-CCHFV IIFT wurde hergestellt wie unter Kapitel 2.2.4.19 und 2.2.1.4 beschrieben.

Jedes Reaktionsfeld des anti-CCHFV IIFT enthielt drei verschiedene BIOCHIPS. Auf dem ersten BIOCHIP befanden sich Zellen, die das rekombinante N-Protein exprimieren, auf dem zweiten BIOCHIP waren Zellen, die das rekombinante G_N/G_C -Protein exprimieren und auf dem dritten BIOCHIP nicht transfizierte Zellen.

Alle CCHFV Proben-Panels (siehe Kap. 2.1.8.6) wurden mit dem anti-CCHFV IIFT untersucht. Die Proben wurden dazu 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Dem Sekundär-Antikörper war zusätzlich Evan's Blue zugesetzt, um die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren. Anti-CCHFV IgM-Titer von $\geq 1:10$ und IgG-Titer von $\geq 1:100$ wurden als positiv bewertet.

2.2.2.7.2 ELISA-Teste zur Bestimmung von anti-CCHFV Antikörpern

Die CCHFV-Panels (siehe Kap. 2.1.8.6) wurden von den Kooperationspartnern mit den in der Tabelle aufgeführten ELISAs untersucht und die Ergebnisse mit denen des IIFTs verglichen.

IgM- und IgG-ELISA	Ort	Kooperationspartner	verwendetes Panel
ELISA Nr. 1	Universität Ljubljana, Slowenien	Ana Saksida und Tatjana Avšic-Županc	CCHFV-Panel 1 und 5
ELISA Nr. 2	Institut Pasteur, Teheran, Iran	Sadegh Chinikar	CCHFV-Panel 2
ELISA Nr. 3	Refik Saydam National Public Health Agency, Ankara, Türkei	Yavuz Uyar, Gülay Korukluoglu und Ahmet Carhan	CCHFV-Panel 3
ELISA Nr. 4	National Institute for Communicable Diseases, Sandringham, Südafrika	Janusz Paweska	CCHFV-Panel 4

2.2.2.7.2.1 ELISA Nr. 1

anti-CCHFV IgM-capture ELISA

Die ELISA-Platte wurde mit 100 μ L 1:500 in PBS verdünntem anti-Human IgM (Biosource, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) über Nacht bei 4 °C inkubiert, dann dreimal gewaschen mit PBS/0,1 % Tween und danach wurden jeweils 100 μ L des 1:100 in Verdünnungspuffer (PBS/0,1 % Tween/5 % Milchpulver/Merthiolat) verdünnten Test- und Kontrollserums in jeweils zwei Vertiefungen aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit PBS/0,1 % Tween gewaschen und im Anschluss wurde jeweils 1:20 mit

Verdünnungspuffer verdünntes, durch γ -Bestrahlung inaktiviertes CCHFV-Antigen bzw. Kontrollantigen in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem erneuten dreifachen Waschschrift, wurden 100 μ L der 1:1000 in Verdünnungspuffer verdünnten anti-CCHFV hyperimmunen Mäuse-Aszitisflüssigkeit aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde dreimal gewaschen und danach wurden je 100 μ L des anti-Maus IgG-Antikörpers (Pierce, Rockford, IL, USA), 1:8000 verdünnt im Verdünnungspuffer, aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurde ABTS-Substrat (KPL, Gaithersburg, MD, USA) zugegeben und nach 30 min Inkubation bei 37 °C bei 410 nm im Photometer gemessen. Die OD-Werte der Negativkontrollen wurden verwendet, um den Mittelwert und die Standardabweichung des Hintergrundes zu berechnen. Eine Probe wurde als positiv betrachtet, wenn ihr OD höher als der Mittelwert der ODs plus die dreifache Standardabweichung der Kontrollseren war. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe des positiven Kontrollserums mitgeführt.

anti-CCHFV IgG-ELISA

Die ELISA-Platte wurde mit 100 μ L 1:1000 in PBS verdünnter anti-CCHFV hyperimmuner Mäuse-Aszitisflüssigkeit über Nacht bei 4 °C inkubiert, dann dreimal gewaschen mit PBS/0,1 % Tween. Danach wurden jeweils 100 μ L des 1:20 in Verdünnungspuffer (PBS/0,1 % Tween/5 % Milchpulver/Merthiolat) verdünnten, durch γ -Bestrahlung inaktivierten, CCHFV-Antigen bzw. Kontrollantigen in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit PBS/0,1 % Tween gewaschen und im Anschluss wurde jeweils, 1:100 mit Verdünnungspuffer verdünntes, Test- und Kontrollserum in jeweils zwei Vertiefungen aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem erneuten dreifachen Waschschrift wurden je 100 μ L des anti-Human IgG-Antikörpers (Accurate Westbury, NY, USA), 1:4000 verdünnt im Verdünnungspuffer, aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurde ABTS-Substrat (KPL, Gaithersburg, MD, USA) zugegeben und nach 30 min Inkubation bei 37 °C bei 410 nm im Photometer gemessen.

Die OD-Werte der Negativkontrollen wurden verwendet, um den Mittelwert und die Standardabweichung des Hintergrundes zu berechnen. Eine Probe wurde als positiv betrachtet, wenn ihr OD höher als der Mittelwert der ODs plus die dreifache Standardabweichung der Kontrollseren war. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe des positiven Kontrollserums mitgeführt.

2.2.2.7.2.2 ELISA Nr. 2

Der IgM-*capture* und der IgG-ELISAs werden mit einem rekombinant hergestellten Nukleocapsidantigen hergestellt. Das rekombinante Protein wird in BSR-Zellen über ein rekombinantes Semliki Forest-Replicon exprimiert [125].

anti-CCHFV IgM-*capture* ELISA

Die ELISA-Platte wurde mit Ziege-anti-Human IgM-Antikörpern (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), 1:900 verdünnt in PBS, über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen und die 1:100 in PBS/0,05 % Tween/5 % Milchpulver verdünnten Testseren und 1:50 verdünnten Kontrollseren für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde wiederum mit PBS/0,05 % Tween gewaschen und das 1:350 in PBS/0,05 % Tween/5 % Milchpulver verdünnte CCHFV- und Kontroll-Antigen für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem weiteren, dreimaligen Waschschrift mit PBS/0,05 % Tween, folgte die einstündige Inkubation, der 1:1000 in PBS/0,05 % Tween/5 % Milchpulver verdünnten, anti-CCHFV hyperimmunen Mäuse-Aszitisflüssigkeit (MAF4 – Institut Pasteur, Dakar, Senegal) bei 37 °C. Die Platte wurde dreimal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen und der 1:350 mit PBS/0,05 % Tween/5 % Milchpulver verdünnte HRP-konjugierte Maus-anti-Human IgG-Antikörper (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) wurde in die Vertiefungen pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem letzten dreifachen Waschschrift mit PBS/0,05 % Tween wurde TMB-Substrat zugegeben und die Reaktion mit 4 N H₂SO₄ abgestoppt. Die Reaktion wurde mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. OD-Werte des anti-CCHF IgM-ELISA > 0,2 galten als positiv.

anti-CCHFV IgG-ELISA

Die ELISA-Platte wurde mit 1:600 in PBS verdünnter hyperimmuner Mäuse-Aszitisflüssigkeit (MAF4 – Institut Pasteur, Dakar, Senegal) über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag dreimal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen. Das CCHF- und das Negativkontrollantigen wurden 1:350 in PBS/0,05 % Tween/5 % Milchpulver verdünnt, auf die Platte gegeben und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde wiederum dreimal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen, die 1:100 in PBS/0,05 % Tween/5 % Milchpulver verdünnten Seren in die Vertiefungen pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften wurde 1:250 in PBS/0,05 % Tween/5 % Milchpulver verdünntes, HRP-konjugiertes Ziege-anti-Human IgG (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen und dann wurde zunächst TMB (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) zugegeben und mit 4 N H₂SO₄ abgestoppt. Die Reaktion wurde mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. OD-Werte des anti-CCHF IgG-ELISA

> 0,2 galten als positiv, während Werte zwischen 0,18 und 0,2 als grenzwertig gewertet wurden.

2.2.2.7.2.3 ELISA Nr. 3

anti-CCHF IgM- und IgG-ELISA

Der verwendete anti-CCHF ELISA wurde vom Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, USA) entwickelt und bereitgestellt. Die Durchführung des anti-CCHF IgM- und IgG-ELISA wurde gemäß den Anleitungen des CDC durchgeführt. Zur Detektion der anti-CCHFV Antikörper wurde inaktivierter, nativer CCHFV (Strain IbAr 10200) verwendet, der auf Vero E6-Zellen angezüchtet wurde.

2.2.2.7.2.4 ELISA Nr. 4

anti-CCHFV IgM-*capture* ELISA

Für den IgM-*capture* ELISA wurden die ELISA-Platten zunächst mit dem Kaninchen-anti-Human IgM-Antikörper (1:500 in PBS) über Nacht bei 4 °C beschichtet (je 100 µL pro Vertiefung) und am nächsten Tag 3-mal mit 300 µL Waschpuffer (0,1 % Tween in PBS) gewaschen. Die Vertiefungen wurden dann mit jeweils 200 µL Blockierungspuffer (10 % Milchpulver in PBS) für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert und erneut wie oben gewaschen. 100 µL der 1:400 in Verdünnungspuffer (2 % Milchpulver in PBS) verdünnten Test- und Kontrollseren wurden dann für 1 h bei 37 °C inkubiert. Mit jedem Serum wurden zwei Vertiefungen inkubiert, eine für das CCHFV-Antigen und eine für das Kontrollantigen. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die entsprechenden Antigene zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde dann 6-mal gewaschen und jeweils 100 µL Maus-anti-CCHFV Serum (1:2000 verdünnt in Verdünnungspuffer) für 1 h bei 37 °C zugegeben. Nach erneutem 3maligem Waschen wurden je 100 µL HRP-konjugiertes anti-Maus IgG (1:6000 in Verdünnungspuffer) in die Vertiefungen pipettiert und wiederum für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach 6maligem Waschen wurden 100 µL ABTS (KPL, Gaithersburg, MD, USA) zupipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µL einer 1 %igen SDS-Stopplösung gestoppt und bei 405 nm gemessen.

Die bereinigte optische Dichte wurde zunächst bestimmt indem die OD der Antigen-Kontrolle von der OD des RVFV-Antigens abgezogen wurde. Der Mittelwert des bereinigten OD-Wertes der hochpositiven Kontrolle und der Probe wurden ermittelt und der Prozentsatz der Positivität (PP) errechnet:

$$PP = \text{bereinigte OD Serum} / \text{mittlere bereinigte OD der hochpositiven Kontrolle} * 100$$

Der IgM-ELISA *cut-off* lag bei einem PP-Wert von ≥ 10 und der Variationskoeffizient von einer Doppelbestimmung sollte nicht > 15 % sein.

anti-CCHFV IgG-ELISA

Die Platten wurden mit 100 µL monoklonalem anti-CCHFV Antikörper, 1:2000 verdünnt in PBS, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platten wurden 3mal für 15 sec mit 300 µL Waschpuffer (PBS/0,1 % Tween) gewaschen und dann wurden 200 µL Blockierungslösung (PBS/10 % Milchpulver) je Vertiefung zugegeben und 1 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden jeweils entweder 100 µL 1:500 in Verdünnungspuffer (PBS/2 % Milchpulver) verdünntes CCHFV-Antigen oder 1:500 verdünntes Kontroll-Antigen in die Vertiefungen pipettiert, so dass jede Serumverdünnung mit beiden Antigenen inkubiert werden konnte. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde die Platte wie oben gewaschen und je 100 µL des 1:400 in Verdünnungspuffer verdünnten Test- und Kontrollserums in jeweils eine Vertiefung mit dem CCHFV- und dem Kontrollantigen pipettiert. Nach einer erneuten Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden die Platten 6-mal gewaschen und jeweils 100 µL HRP-gekoppeltes anti-Human IgG zugegeben, 1 h bei 37 °C inkubiert und wiederum 6-mal gewaschen. Es wurden 100 µL ABTS (KPL, Gaithersburg, MD, USA) zupipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µL einer 1 %igen SDS-Stopplösung gestoppt und bei 405 nm gemessen.

Die Entwicklung und Berechnung der OD-Werte geschah wie oben im Protokoll des IgM-capture ELISAs beschrieben. Der IgG-ELISA *cut-off* lag bei einem PP-Wert von $\geq 8,4$.

2.2.3 Statistische Methoden

Die Sensitivität und Spezifität geben die Wahrscheinlichkeit wieder, mit der ein positives Serum auch durch ein positives Ergebnis erkannt wird bzw. mit der ein negatives Serum als negativ erkannt wird (richtig positive Diagnose pro Gesamtanzahl der tatsächlich positiven Seren bzw. richtig negative Diagnose pro Gesamtanzahl der tatsächlich negativen Seren). Der positive Vorhersagewert hingegen ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Person mit einem positiven Test-Ergebnis auch tatsächlich positiv ist (richtig positive Ergebnisse pro Gesamtanzahl der positiven Ergebnisse) und der negative Vorhersagewert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Person mit einem negativen Test-Ergebnis tatsächlich nicht positiv ist (richtig negative Ergebnisse pro Gesamtanzahl der negativen Ergebnisse) [34]. Die Sensitivität, Spezifität, sowie der positive und negative Vorhersagewert wurden mit den Formeln aus Abbildung 2.2-1 und Abbildung 2.2-2 berechnet.

Die 95 % Konfidenzintervalle (95 % CI) wurden mit der Wilson-Methode berechnet [188]. Die Überprüfung der Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test und die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede mittels des Student's t-Test für unverbundene Stichproben bzw. des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

		Krankheit *		total
		vorhanden	nicht vorhanden	
Test	pos	a	b	a + b
	neg	c	d	c + d
total		a + c	b + d	a + b + c + d = n

Abbildung 2.2-1: Vierfelder-Tafel zur Berechnung der Sensitivität, Spezifität sowie der positiven und negativen Vorhersagewerte. * diagnostiziert mit Referenztest.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtig-positiver Resultate}}{\text{Anzahl derer mit Krankheit}} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtig-negativer Resultate}}{\text{Anzahl derer ohne Krankheit}} = \frac{d}{b + d}$$

$$\text{pos. Vorhersagewert} = \frac{\text{Anzahl richtig-positiver Resultate}}{\text{Anzahl richtig- und falsch-positiver Resultate}} = \frac{a}{a + b}$$

$$\text{neg. Vorhersagewert} = \frac{\text{Anzahl richtig-negativer Resultate}}{\text{Anzahl richtig- und falsch-negativer Resultate}} = \frac{d}{c + d}$$

Abbildung 2.2-2: Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des negativen und positiven Vorhersagewertes mittels der Vierfelder-Tafel. Zur Ermittlung der Prozentzahlen, jeweils noch Multiplikation mit 100.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

Die Arbeit mit Nukleinsäuren und besonders mit RNA verlangt eine gute Laborpraxis. Daher wurden alle Plastikmaterialien bei 120 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Weitere Utensilien wurden regelmäßig mit 0,1 M HCl behandelt und mit UV-Licht bestrahlt, um Nukleinsäurekontaminationen und RNase- und DNase-Aktivität zu verhindern. Generell wurde nur kommerziell erhältliches Wasser molekularbiologischer Reinheit (*Aqua mol.*) verwendet.

Die Verwendung von Kits erfolgte, wenn nicht im folgenden Text anders angegeben, laut Hersteller-Anweisungen. Alle im Folgenden aufgeführten Puffer sind Bestandteile der verwendeten Kits und wurden benannt, wie in den Handbüchern der Hersteller beschrieben.

2.2.4.1 Isolierung viraler RNA aus Zellkulturüberständen

Zur Isolation von viraler RNA wurde das QIAamp® Viral RNA Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Probe wird dabei unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert, um die RNA aus den Viruspartikeln freizusetzen und RNasen zu inaktivieren. Zugesezte, sogenannte *carrier* RNA soll die unspezifische Bindung der RNA an Plastikoberflächen verhindern. Die freigesetzte, virale RNA wird mit Hilfe einer Silikagel-Membran aus der Probe extrahiert und über Waschschrirte gereinigt. Die anschließend aus der Membran eluierte Probe ist frei von Proteinen, Nukleasen und anderen kontaminierenden Stoffen.

Die virale RNA wurde aus dem zu verwendenden Zellkulturüberstand gemäß der Herstellerangaben im Handbuch (Stand 12/2005) eluiert und entweder direkt weiterverwendet oder aber zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

2.2.4.2 Reverse Transkription von viraler RNA

Die reverse Transkription (RT) dient der Herstellung von stabiler *complementary* DNA (cDNA) aus RNA. Mit Hilfe der reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase wird die RNA in 5'-Richtung umgeschrieben. Es können entweder oligo(dT)-Primer eingesetzt werden, die an den Poly(A)-Schwanz der mRNA binden, *Random Hexamer* Primer, die zufällig binden oder aber spezifische Primer, die an eine bekannte Sequenz der zu transkribierenden RNA binden. Das entstehende RNA/DNA-Hybrid kann nachfolgend in der PCR eingesetzt werden.

Zur cDNA-Synthese wurde die reverse Transkriptase Superscript®II (Invitrogen) eingesetzt. Superscript®II ist eine modifizierte M-MLV reverse Transkriptase, die ursprünglich aus dem Moloney Murinen Leukämievirus stammt. Sie hat im Gegensatz zur M-MLV reversen Transkriptase ein höheres Temperaturoptimum und keine RNaseH-Aktivität, so dass längere Transkripte gebildet werden.

Reagenz	Volumen [µL]
5 x RT-Puffer	4,0
dNTP-Mix [10 mM]	0,4
Random Primer [100 ng/µL]	0,4
DTT [0,1 M]	0,5
Superscript®II [200 U/µL]	0,5
<i>Aqua mol.</i>	9,2
Gesamtvolumen	15,0

Tabelle 2.2-1: RT. Reaktionsansatz

Je 5 µL der RNA wurden zunächst für 10 min auf 65 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu lösen. Die RNA wurde im Anschluss direkt auf Eis gestellt, um ihre denaturierte Form zu stabilisieren. Zu der gekühlten RNA wurden dann 15 µL des vorbereiteten RT-Mix gegeben und der Ansatz wurde zunächst für 5 min auf Eis und dann für 60 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Reaktion bei 94 °C für 5 min abgestoppt wurde.

2.2.4.3 Polymerasekettenreaktionen

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der zyklischen Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten. Prinzipiell wird zum einen die besondere Fähigkeit der hitzestabilen DNA-Polymerase genutzt, die aus *Thermus aquaticus* stammt und deren optimale Arbeitstemperatur bei 72 °C liegt. Zum anderen nutzt man die Tatsache, dass die doppelsträngige DNA bei 94 °C denaturiert. Der Prozess der PCR kann in drei Phasen unterteilt werden.

1. Denaturierung: Durch die Hitze werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaarungen zerstört und die doppelsträngige DNA teilt sich in beide Einzelstränge.
2. Annealing: Die jeweiligen Oligonukleotidprimer binden an ihre komplementären DNA-Sequenzen und flankieren das zu amplifizierende Gebiet. Die spezifische Temperatur bei der die Anlagerung optimal erfolgt, liegt 2 - 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m), die für jeden Primer mit z.B. folgender Formel annäherungsweise berechnet werden kann: $T_m = (G+C) * 4 + (A+T) * 2$
3. Elongation: An die 3'-OH Enden der Primer werden durch die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase passende, freie Desoxynukleotide synthetisiert. Dieser Prozess erfolgt mit einer Geschwindigkeit von 1000 Basenpaaren pro Minute.

Insgesamt werden diese drei Phasen 25 - 40mal wiederholt. In jedem Zyklus dient die DNA aus dem vorangegangenen Zyklus als Matrize, was demnach zu einer exponentiellen Steigerung der Menge der DNA-Fragmente führt.

Folgendes Protokoll wurde standardmäßig verwendet. Bei Vorliegen von starken Sekundärstrukturen wurde dem Reaktionsansatz 5 % DMSO zugesetzt.

Reagenz	Volumen [μ L]
10 x DNA-Polymerase-Puffer	2,0
MgCl [50 mM]	0,6
dNTP-Mix [10 mM]	0,4
Primer sense [10 μ M]	0,5
Primer antisense [10 μ M]	0,5
<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/ μ L]	0,1
DMSO (fakultativ)	1,0
cDNA.	2,5
<i>Aqua mol</i>	ad 20,0

Tabelle 2.2-2: PCR. Reaktionsansatz

Reaktionsschritt	Dauer	T [$^{\circ}$ C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	2 min	94	40
Denaturierung	15 sec	94	
Annealing	30 sec	primerspezifisch	
Elongation	60 sec/1000 bp	72	
Termination (fakultativ)	3 min	72	
Kühlung		4	

Tabelle 2.2-3: PCR. Reaktionsbedingungen

2.2.4.4 SuperScript™ OneStep RT-PCR mit Platinum® Taq

Für die Klonierung der DENV NS1-Sequenzen wurde das SuperScript™ OneStep RT-PCR Kit verwendet.

In diesem Kit sind sowohl die Komponenten für die cDNA-Synthese, wie auch für die PCR vereint. Die cDNA-Synthese erfolgt durch die Superscript™ II Reverse Transkriptase mit genspezifischen Primern im gleichen Reaktionsröhrchen wie die nachfolgende PCR. Während der RT-Reaktion bleibt die Platinum® *Taq* DNA Polymerase inaktiv, da sie durch einen Antikörper komplexiert wird, der die Aktivität der Polymerase verhindert. Durch einen Denaturierungsschritt bei 94 $^{\circ}$ C vor Beginn der PCR wird der Antikörper denaturiert und das Enzym kann aktiv werden.

Die OneStep Reaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Reagenz	Volumen [μL]	Dauer	T [$^{\circ}\text{C}$]	Zyklen
2 x Reaktionsmix	12,50	30 min	45	40
Primer sense [10 μM]	1,00	2 min	94	
Primer antisense [10 μM]	1,00	15 sec	94	
RT/Platinum [®] <i>Taq</i> Mix	0,50	30 sec	55	
DMSO	1,25	1 min/kb	72	
RNA	2,00	10 min	72	
ad <i>Aqua mol.</i>	25,00	Pause	4	

Tabelle 2.2-4: SuperScript[™] OneStep RT-PCR. Reaktionsansatz und -bedingungen

2.2.4.5 Mykoplasmen-PCR

Die Zellen wurden regelmäßig auf die intrazellulären Parasiten der Gattung Mykoplasma, Ureaplasma, Acholeplasma und Spiroplasma getestet. Der Nachweis beruht auf der Amplifikation eines für diese Gattungen spezifischen 280 bp-Fragments des 16S-rRNA-Gens [189].

Die Proben wurden zunächst für 5 min auf 95 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt und im Anschluss 1:10 verdünnt in die Mykoplasmen-PCR eingesetzt.

Reagenz	Volumen [μL]	Dauer	T [$^{\circ}\text{C}$]	Zyklen
10 x DNA-Polymerase-Puffer	2,50	5 min	94	41
MgCl [50 mM]	0,75	3 min	72	
dNTP-Mix [2,5 mM]	0,50	45 sec	94	
GPO-3-Primer [50 μM]	0,50	45 sec	55	
MGSO-Primer [50 μM]	0,50	10 min	72	
<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/ μL]	0,10	10 min	27	
Aqua mol.	15,15	Pause	4	
	22,50			
Probe (1:10 verdünnt)	5,00			
Gesamtvolumen	25,00			

Tabelle 2.2-5: Mykoplasmen-PCR. Reaktionsansatz und -bedingungen

2.2.4.6 Kolonie-PCR

Mit Hilfe einer Kolonie-PCR ist es möglich herauszufinden, ob transformierte *E.coli*-Bakterien Plasmide mit korrekt eingebauten DNA-Fragmenten aufgenommen und amplifiziert haben. Durch das Auftauen und Einfrieren der Bakteriensuspension werden die Plasmide aus den Bakterien freigesetzt und können in der PCR detektiert werden.

Jeweils 50 μL H_2O wurden mit je einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte beimpft. Von dieser Lösung wurden 5 μL in 50 μL flüssiges LB-Medium überführt. Dieses LB-Medium

wurde bei 4 °C gelagert und konnte bei einem positiven Kolonie-PCR-Ergebnis zum Beimpfen einer nachfolgenden Kultur verwendet werden (siehe Kap. 2.2.4.14).

Die wässrige Bakterienlösung wurde gemixt, bei -80 °C eingefroren, aufgetaut, wieder gemixt und danach bei 100 °C aufgeköcht. Die Lösung wurde zentrifugiert (1 min, 10.000 * g) und 2,5 µL des Überstands wurden in der nachfolgenden PCR (siehe Kap. 2.2.4.3) eingesetzt

2.2.4.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde mittels des ABI PRISM® Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Methode beruht auf der Sequenzierung nach Sanger [190], wonach es durch den Einbau von Didesoxynukleotiden zum Kettenabbruch kommt. Im verwendeten Kit sind die Didesoxynukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die resultierenden, markierten Fragmente unterschiedlicher Länge werden in einer hochauflösenden Kapillar-Gel-Elektrophorese getrennt und im Anschluss wird die Sequenz mittels eines Lasers ausgelesen.

Zur Sequenzierung wurden pro Plasmid-DNA ca. 200 ng pro 10 µL-Ansatz verwendet.

Reagenz	Volumen [µL]	Dauer	T [°C]	Zyklen
Big Dye-Puffer	1,5	2 min	96	25
Big Dye 3.1 Mix	1,0	10 sec	96	
Primer [10 µM]	0,5	5 sec	50 - 60*	
DNA	je nach Konzentration	4 min	60	
<i>ad Aqua mol.</i>	10		4	

Tabelle 2.2-6: Sequenzierung. Reaktionsansatz und -bedingungen

* Temperatur unterschiedlich, je nach verwendetem Primer (siehe Kap. 2.1.4.2).

Die nachfolgende Sequenzierung wurde von der Sequenzier-Abteilung des Robert Koch-Instituts durchgeführt.

2.2.4.8 Phylogenetische Analyse

Die Untersuchung der Veränderungen in der Nukleotidsequenz der RNA und DNA von Organismen lässt Rückschlüsse auf ihre Evolution und ihre Verwandtschaftsverhältnisse zu, da die Organismen mit der Zeit immer mehr Mutationen in ihrer Nukleotidsequenz akkumulieren. Nah verwandte Viren z.B. zeigen eine hohe Übereinstimmung ihrer Nukleotidsequenz, während Viren, die entfernt verwand sind, eine größere Anzahl von Unterschieden aufweisen. Durch eine phylogenetische Analyse, d.h. einem in der Regel Computer-gestützten Vergleich verschiedener Nukleinsequenzen können die Verwandtschaftsverhältnisse aufgeklärt werden.

In der Regel verwendet man für phylogenetische Analysen Sequenzbereiche mit hohen Mutationsraten, da dadurch auch Verwandtschaftsbeziehungen von sehr nach verwandten Stämmen, die sich erst vor kurzer Zeit aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben, untersucht werden können.

Die Sequenzen der Vergleichs-Stämme wurden von der Datenbank des National Centers for Biotechnology Information (NCBI) bezogen. Die phylogenetische Analyse wurde mit der Mega Software Version 4.1 und 5.0 durchgeführt [191,192].

2.2.4.9 Agarosegel-Elektrophorese von DNA

Die Tatsache, dass Nukleinsäuren durch ihr Zuckerphosphat-Rückgrat negativ geladen sind, macht man sich bei der Auftrennung von DNA im elektrischen Feld in der Agarosegel-Elektrophorese zu Nutze. Durch die Pufferbedingungen wird die negative Gesamtladung der Nukleinsäuren erhalten und eine Wanderung zur Anode im Gleichstromfeld ermöglicht. Mit Hilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid, kann zudem die aufgetrennte DNA durch UV-Licht (365 nm) sichtbar gemacht werden.

Es wurden für die DNA-Auftrennung 2 %ige Agarosegele mit 0,5 µg/mL Etidiumbromid hergestellt. Zur Herstellung der Gele und des Laufpuffers wurde TBE-Puffer verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel im 6fach-Probenpuffer verdünnt. Als Größenstandard wurde entsprechend der zu analysierenden DNA-Fragmente, ein 100 bp- bzw. 1 kb-DNA-Leiter mitgeführt. Die Proben wurden bei 100 V aufgetrennt.

2.2.4.10 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick[®] Gelextraktions-Kits von Qiagen. Die DNA bindet hierbei zunächst unter hohen Salzkonzentrationen an eine Silikagel-Membran, wird im Anschluss aufgereinigt und kann dann durch eine Lösung mit niedrigem Salzgehalt eluiert werden.

Die DNA wurde gemäß der Herstellerangaben im Handbuch (Stand 03/2008) isoliert und die Konzentration im Anschluss photometrisch gemessen (siehe Kap. 2.2.4.18).

2.2.4.11 Restriktionsverdau von DNA

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide wurde die DNA durch Restriktionsendonukleasen an spezifischen Stellen geschnitten. Restriktionsendonukleasen sind befähigt palindromische DNA Sequenzen zu erkennen und daraufhin die DNA spezifisch zwischen bestimmten Nukleotiden zu hydrolysieren. Je nach verwendetem Restriktionsenzym entsteht ein DNA-Ende mit keinem (*blunt*) oder mit einer bestimmten Anzahl von Einzelnukleotidüberhängen (*sticky*). Generell kann eine Unit eines

Restriktionsenzym 1 µg λ DNA in 1 h bei einer für das Enzym spezifischen Temperatur (normalerweise zwischen 30 und 37 °C) scheiden.

Die Methode des Restriktionsverdau wurde für die Klonierung der spezifischen DNA-Fragmente in den pTriEx-3-Vektor verwendet. Zunächst wurde eine PCR mit den entsprechenden, die Restriktionsschnittstelle enthaltenden Primern (siehe Kap. 2.1.4.2) durchgeführt. 3 µL des aufgereinigten PCR-Produkts bzw. des entsprechenden Vektors wurden in einem Restriktionsansatz von 30 µL eingesetzt. Von beiden verwendeten Enzymen wurden entsprechend der Herstellerangaben 0,6 - 1,2 µL (12 - 24 Units) eingesetzt. Außerdem wurde ein Puffer ausgewählt, der für beide Enzyme ähnlich gute Bedingungen bot, so dass möglichst das Reaktionsoptimum erreicht werden konnte. Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert, bevor die Restriktionsenzyme bei 60 °C für 20 min inaktiviert wurden. Anschließend wurden die verdauten PCR-Produkte und Vektoren in der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, die Fragmente ausgeschnitten und mit dem QIAquick® Gelextraktions Kit aufgereinigt (siehe Kap. 2.2.4.10). Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.4.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der PCR-Fragmente in den linearisierten Vektor erfolgt mit der T4-DNA-Ligase, die die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Molekülen katalysiert.

Dafür wurde 50 ng des verdauten Vektors und das verdaute PCR-Fragmente in einem Verhältnis von 1:3 in einen Ansatz von 10 µL gegeben. Nach Zugabe von 2 µL 5 x Ligationspuffer und 0,2 µL T4-DNA-Ligase [5 U/µL] wurde der Ansatz über Nacht auf Eis inkubiert, bis das Eis geschmolzen ist. Dadurch wurden graduell verschiedene Temperaturbereiche durchschritten. Im Anschluss wurde der Ansatz zur Transformation von TOP10 *E.coli*-Zellen (siehe Kap. 2.2.4.16) verwendet.

2.2.4.13 Klonierungen mit Hilfe des QIAGEN PCR Cloning Kits

Die *Taq*-Polymerase hat als durch ihre unspezifische terminale Transferaseaktivität die Eigenschaft einzelne Desoxyadenosine an das 3'-Ende der PCR-Produkte zu synthetisieren. Diese Tatsache wird genutzt für die Klonierung dieser PCR-Produkte. Der im QIAGEN PCR Cloning Kit zur Verfügung gestellte, linearisierte Vektor besitzt einen Überhang eines 3'-Desoxyuridins und demnach kann das PCR-Produkt effizient an den Vektor ligiert werden. Die Selektion verläuft über das *Blue/White-Screening*. Die Plasmide enthalten das *lacZ'*-Gen, das für das N-terminale Fragment der β-Galactosidase kodiert. Alleine ist dieses Fragment nicht reaktiv, aber kann die *lacZ*ΔM15-Mutation der TOP10 Bakterien komplementieren. Innerhalb des *lacZ'*-Gens liegt die *multiple cloning site* (MCS), d.h. bei

erfolgreicher Klonierung des gesuchten Gens in das Plasmid wird der Leserahmen des lacZ'-Gens zerstört. Es entwickeln sich weiße Kolonien. Bakterien mit religierten Plasmiden hingegen, bei denen das lacZ'-Gen erhalten geblieben ist, produzieren bei Induktion durch IPTG β -Galactosidase und können somit die farblose Substanz X-Gal in einen blauen, wasserunlöslichen Indigofarbstoff umwandeln. Es entstehen blaue Bakterienkolonien.

Hierfür wurden 2 μ L des frisch hergestellten PCR-Produktes mit 2,5 μ L 2 x Ligation-Master-Mix und 0,5 μ L des pDrive Cloning Vektors über Nacht auf Eis inkubiert, bis dieses geschmolzen ist. Durch das Tauen des Eis werden graduell verschiedene Temperaturbereiche durchschritten. Der Ansatz wurde zur Transformation von TOP10 *E.coli* Bakterien verwendet (siehe Kap. 2.2.4.16).

Die transformierten Bakterien wurden auf feste LB-Medium-Platten mit Ampicillin ausgestrichen, die zuvor zusätzlich mit 10 μ L der IPTG- und 40 μ L der X-Gal-Lösung behandelt wurden.

2.2.4.14 Kultivierung von *E.coli*-Bakterien

E.coli-Bakterien wurden bei 37 °C kultiviert, entweder unter ständigem Schütteln in flüssigem LB-Medium oder auf festem LB-Medium. Zu beiden Medien wurden jeweils 100 μ g/mL Ampicillin zugegeben, falls auf die Bakterien selektioniert werden sollte, die die entsprechenden Plasmide mit Ampicillinresistenz enthielten.

Die Lagerung der Bakterien erfolgte über längere Zeiträume bei -80 °C. Dafür wurden 850 μ L einer 5 mL-Übernachtskultur mit 150 μ L 100 % Glycerin versetzt und in einem thermostabilen Gefäß eingefroren.

Zum Auftauen der Bakterien war es ausreichend ein wenig Material von der Oberfläche des eingefrorenen Röhrchens abzukratzen, in eine 5 mL LB-Flüssigkultur mit Antibiotikum zu überführen und diese über Nacht bei 37 °C zu inkubieren.

2.2.4.15 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Bakterien

Eine Einzelkolonie *E.coli*-Bakterien wurde über Nacht in einer 5 mL-LB-Flüssigkultur angezüchtet. Mit 2,5 mL dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Tag 250 mL LB-Medium beimpft bei 37 °C kultiviert. Die OD₆₀₀ der Kultur wurde regelmäßig kontrolliert, um Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu erhalten. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 wurden die Zellen auf 4 °C gekühlt und 5 min bei 6000 * g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 mL eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde es wie zuvor pelletiert, in 8 mL TFB II-Puffer aufgenommen und in Fraktionen á 80 μ L aufgeteilt. Die Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle der kompetenten Bakterien wurde eine Testtransformation durchgeführt.

2.2.4.16 Transformation von *E.coli*-Bakterien

Transformation bezeichnet die Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterien.

Die Behandlung der Zellen mit Rubidium- und Calciumchlorid führt, dazu, dass sich die negativ-geladene DNA an die negativ geladene Zellmembran anlagern kann. Es wird daraufhin ein Hitzeschock durchgeführt, bei dem Poren in der Membran entstehen, so dass die DNA in die Zellen gelangen kann.

Die kompetenten *E.coli*-Bakterien (50 µL) wurden hierzu auf Eis aufgetaut und mit 450 µL kaltem CaCl₂ versetzt. 0,2 µg bzw. der komplette Ligationsansatz wurden zu 100 µL der Bakterien-CaCl₂ Suspension gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Hitzeschockbehandlung erfolgte für 45 sec bei 43 °C. Die Zellen wurden dann zunächst für 2 min auf Eis abgekühlt, dann mit 200 µL SOC-Medium versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf Platten mit festem, ampicillinhaltigem LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin) aufgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

2.2.4.17 Isolierung von Plasmid-DNA

Mini Plasmid Präparation

Nach der Identifikation von plasmid-haltigen *E.coli*-Klonen in der Kolonie-PCR (siehe Kap. 2.2.4.6), wurden 5 mL-Kulturen (LB-Medium mit Ampicillin) angelegt und schüttelnd, über Nacht, bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung der Plasmide aus der Übernachtskultur erfolgte mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini Kit. Die Plasmid-DNA wird durch die alkalische Lyse in Anwesenheit von RNase und einer anschließenden Zentrifugation von der genomischen DNA, sowie präzipitierten Proteinen und weiteren Zellbestandteilen getrennt. Die Plasmid-DNA kann dann an die Membran der Säulen binden, wird durch einen weiteren Waschschrift gereinigt und kann durch einen Puffer mit niedriger Salzkonzentration wieder eluiert werden.

Die Plasmid-DNA wurde gemäß der Herstellerangaben im Handbuch (Stand 07/2008) isoliert. Im Anschluss wurde photometrisch die Konzentration der DNA im Eluat bestimmt (siehe Kap. 2.2.4.18) und die Plasmid-DNA sequenziert, um die korrekten Klonierung zu gewährleisten (siehe Kap. 2.2.4.3).

Maxi Plasmid Präparation

Für die Transfektion von eukaryotischen Zellen wurden große Mengen Plasmid-DNA benötigt. Die Gewinnung erfolgte mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen. Durch das Kit wird sichergestellt, dass Endotoxine beseitigt werden, da diese u.a. die Transfektionseffizienz reduzieren können.

Alle verwendeten Plasmide waren *high-copy* Plasmide und wurden gemäß der Herstellerangaben im Handbuch (Stand 11/2005) isoliert. Die DNA-Konzentration wurde

im Anschluss photometrisch bestimmt (siehe Kap. 2.2.4.18) und die DNA auf 0,5 µg/µL eingestellt.

2.2.4.18 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht bei 260 nm und daher kann ihre Konzentration photometrisch bestimmt werden. Eine OD_{260} von 1 (bei 1 cm Schichtdicke) entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/mL und einer RNA-Konzentration von 40 µg/mL. Die Absorptionsmessung bei 280 nm dient zudem zur Detektion möglicher Proteinverunreinigungen. Bei reinen Nukleinsäurelösungen sollte der Quotient E_{260}/E_{280} zwischen 1,8 und 2 liegen. Hingegen deutet eine hohe Absorption bei 230 nm auf Verunreinigungen durch z. B. Kohlenhydrate, Peptide, Phenole oder aromatische Verbindungen hin. Bei reinen Proben sollte der Quotient E_{260}/E_{230} größer als 2 sein. Auch Trübungen der Lösung und andere Störfaktoren können photometrisch detektiert werden. Hierzu dient der Absorptionswert bei 320 nm, der bei reinen Proben bei null liegen sollte. Zur Berechnung der DNA-Konzentration aus den Extrinktionswerten kann folgende Formel verwendet werden:

$$\text{DNA-Konzentration} = (E_{260} - E_{320}) * d * f \text{ [}\mu\text{g/mL]}$$

E = Extinktion

d = Verdünnungsfaktor

f = Faktor für DNA (50 µg/mL) und RNA (40 µg/mL) bei 1 cm Küvettenschichtdicke

Die Nukleinsäure-Messung wurde am Eppendorf Biophotometer mit den passenden Einmal-Plastik-Küvetten mit 1 cm Schichtdicke bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser als Referenz durchgeführt.

2.2.4.19 Transfektion von eukaryotischen Zellen zur IIFT-Herstellung

Die Transfektion der eukaryotischen Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI). PEI ist ein positiv-geladenes Polymer und kann daher mit der negativ geladenen DNA in wässrigem Milieu lösliche Komplexe bilden. Die entstandenen Komplexe haben eine positive Nettoladung und werden bei Interaktion mit dem Heparansulfat-Proteoglycanen auf der Zellmembran, von den Zellen endozytiert. Die freien Stickstoffatome des PEI können bei niedrigerem pH im Endosom vermehrt freie Protonen anlagern. Das führt zum vermehrten Influx von Chlorid-Ionen und nachfolgend von Wasser, was mit der Zeit zur Schwellung und zum Zerreißen der Endosomen führt, noch bevor es zur Verschmelzung mit den Lysosomen kommt. Man spricht auch vom „Protonenschwamm-Effekt“ [193].

Zur Transfektion der eukaryotischen Zellen wurden diese einen Tag vor der Durchführung der Transfektion 1:2 umgesetzt, um das Wachstum der Zellen anzuregen.

Die Zellen wurden am Tag des Versuches abtrypsinisiert und abzentrifugiert wie unter (siehe Kap. 2.2.1.1) beschrieben. Es wurde zunächst ein Tropfen Medium in die Quadripermschalen pipettiert und dann die Deckgläser daraufgelegt. Dann wurden je Deckglas 6 mL der Zellsuspension mit einer Konzentration von $1,5 - 2,5 \cdot 10^5$ mäanderförmig auf die Deckgläser ausgesät und für 5 Stunden im Brutschrank kultiviert, damit sie anwachsen konnten.

Das Transfektionsreagenz für ein Deckglas (26 x 76 mm) wurde aus dem Plasmid [0,5 µg/µL in H₂O], 0,9 %igem NaCl und Polyethylenimin hergestellt und 15 – 20 min bei RT inkubiert. Dann wurde Kulturmedium zum Transfektionsmix dazugegeben. Von den eingesäten Zellen wurde im Anschluss das Medium abgenommen und das Transfektionsreagenz langsam auf beiden Seiten der Kulturschale von der Schalenwand auf die Zellen laufen gelassen.

Als Negativkontrolle diente ein Deckglas, auf das statt des Transfektionsreagenz eine Mischung aus Medium und 0,9 %igem NaCl gegeben wurde.

Nach 2 – 4 h wurden jeweils 25 U/mL Penicillin und Streptomycin zugegeben.

Die Fixierung der Zellen erfolgte, abhängig vom verwendeten Plasmid nach 24 oder 48 h mittels Aceton. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS und Schutzlösung abgespült und dann mit Aceton fixiert.

Die Deckgläser wurden dann mittels eines Glasschneiders in kleine Stücke geschnitten und auf Deckgläser aufgebracht. Die Objektträger wurden dann wie unter Kapitel 2.2.2.1 beschrieben in der Immunfluoreszenz eingesetzt.

2.2.4.20 Transfektion von eukaryotischen Zellen zur Analyse im Western Blot

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen zur Proteinisolierung für die nachfolgende Analyse im Western Blot erfolgte in 6-Loch-Platten nach dem Protokoll unter Kapitel 2.2.4.19. Vor dem Einsäen der Zellen wurde die Oberfläche der 6-Loch-Platte mit 600 µL Poly-L-Lysin für 10 min beschichtet und dann das Poly-L-Lysin wieder abgenommen und die Vertiefungen einmal mit PBS gespült. Dazu wurden 3 mL der HEK 293^{RKI}-Zell-Lösung mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/mL in die Vertiefungen eingesät und 5 h später transfiziert. Pro Vertiefung wurde ein Transfektionsmix aus Plasmid [0,5 µg/µL in H₂O], 0,9 %igem NaCl und Polyethylenimin angesetzt. Die Mock-Kontrolle wurde mit einem entsprechenden Mix aus 0,9 %igem NaCl und Polyethylenimin, ohne DNA-Zugabe, behandelt. Der Transfektionsmix wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die Zellen gegeben. Nach zwei Tagen Inkubation bei 37 °C wurden die Proteine aus dem Zellkulturüberstand und aus den Zellen isoliert (siehe Kap. 2.2.5.1).

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Proteinisolierung aus Zellen und Zellkulturüberstand

Zur Analyse der Expression der heterolog exprimierten Proteine in den transfizierten Zellen, wurden die Proteine isoliert und im Western Blot untersucht. Der Zellkulturüberstand wurde von den Zellen abgenommen und für 5 min bei 4000 * g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und bei -20 °C eingefroren.

Die Zellen wurden zunächst dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, damit der Zellmetabolismus und vor allem die Aktivität der Proteasen verlangsamt und der restliche Überstand abgewaschen wurde. Die Zellen wurden vom Boden der 6-Loch-Platte mit 800 µL abgespült, für 5 min bei 1000 * g und 4 °C abzentrifugiert und im Anschluss mit dem RIPA-Puffer lysiert. Der RIPA-Puffer wurde zuvor mit Protease Inhibitor Cocktail III (1:100), Benzonase (1:5000) und 1mM DTT komplettiert. Das Gemisch wurde für 20 min auf Eis inkubiert und nach einer Zentrifugation für 10 min bei 15.000 * g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und für die Analyse im Western Blot verwendet.

2.2.5.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode [194] mit dem Coomassie PlusTM Reagenz. Bei dieser Methode bildet der Farbstoff in saurerer Lösung mit kationischen, nicht-polaren und hydrophoben Aminosäuren Komplexe. Dadurch ändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm.

Es wurden BSA-Standard-Verdünnungen von 1 mg/mL bis 31,25 µg/mL hergestellt und jeweils 6,25 µL dieser BSA-Verdünnungen mit 187,5 µL des Coomassie PlusTM Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm im Biophotometer (Eppendorf) gemessen. Mit den resultierenden Werten wurde im Photometer eine Standardkurve erstellt, die für die weiteren Bestimmungen verwendet werden konnte.

Entsprechend den Standardproben wurden die zu bestimmenden Proben im Coomassie PlusTM Reagenz aufgenommen, gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve bestimmt.

2.2.5.3 Western Blot

SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis)

Die SDS-PAGE-Methode dient der Auftrennung von denaturierten Proteinen im elektrischen Feld. Die Proteine werden mit SDS im Überschuss versetzt und stark erhitzt, um die Wasserstoffbrücken zu zerstören und somit eine Streckung der Proteine zu

erreichen. Zusätzlich wird β -Mercapthoethanol zugegeben, das Disulfidbrücken zu reduzieren. Das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und linearisiert die Proteine, lagert sich an und maskiert die unterschiedlichen Ladungen der Aminosäuren. Durch das SDS erhalten die Proteine eine konstant negative Ladung, entsprechend ihres Gewichtes (1.4 g SDS/1 g Protein in 1% SDS-Lösung). Im elektrischen Feld können die Polypeptide anschließend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Es wurden diskontinuierliche SDS-PAGE-Gele verwendet mit einem Sammel- und einem Trenngel. Das hat den Vorteil, dass an der Trennschicht beider Gele die Proteine unterschiedlicher Größen aufkonzentriert werden und, so eine Schärfung der Proteinbanden erreicht wird.

Sammelgel		Trenngel	
Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
Aqua dest.	1,88 mL	Aqua dest.	1,75 mL
2 M Tris (pH 8.8)	1,05 mL	0.5 M Tris (pH 6.8)	0,5 mL
20% SDS	25 μ L	20% SDS	18,75 μ L
PAA	1,98 mL	PAA	0,63 mL
		60% Sucrose	0,88 mL
APS	60 μ L	APS	31,25 μ L
TEMED	7,5 μ L	TEMED	3,13 μ L

Tabelle 2.2-7: Bestandteile eines 12 %igen SDS-PAGE-Gels

Die Proben wurde mit β -Mercapthoethanol-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min erhitzt. Nach der Beladung des Gels erfolgte der Elektrophoreselauf mit einer Feldstärke von 14 V/cm für ca. 45 min.

Transfer auf die Nitrozellulosemembran

Die negativ geladenen Proteine wurden im Anschluss an die SDS-PAGE im elektrischen Feld in einer Semi-Dry-Blottingapparatur aus dem SDS-PAGE-Gel auf eine Nitrozellulosemembran überführt.

Dazu wurde das Gel, die Membran, sowie das Blottingpapier (Whatman-Paper) in Transferpuffer für 5 min äquilibriert und danach der Blot wie in Abbildung 2.2-3 dargestellt aufgebaut. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer Stromstärke von 200 mA (3,5 mA/cm² für 2 h).

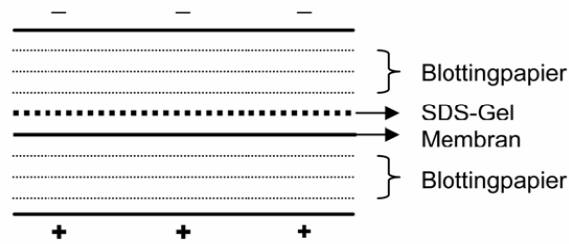


Abbildung 2.2-3: Aufbau des Semi-Dry-Blots

Mittels einer Ponceau-Färbung wurde anschließend die erfolgreiche Proteinübertragung auf die Nitrozellulosemembran überprüft. Dazu wurde die Membran 2 min in der Ponceaurot-Lösung inkubiert und dann mit Aqua dest. abgespült. Die weitere Entfärbung erfolgte in PBST. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen und um den Hintergrund zu reduzieren, erfolgte eine Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer.

Proteindetektion

Die Membran wurde zur Proteindetektion mit dem in WB-Antikörperverdünnungspuffer verdünnten primären Antikörper (siehe Kap. 2.1.5) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 10 min mit WB-Waschpuffer gewaschen und wiederum für 1 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper, verdünnt in WB-Antikörperverdünnungspuffer, inkubiert. Drei weiteren 10-minütigen Waschschritten mit WB-Waschpuffer folgten. Zum Nachweis der Antikörperbindung diente das Chemilumineszenz-Substrat SuperSignal® West Femto. Die Membran wurde mit Substrat überschichtet und mit einer Folie abgedeckt. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde die Membran in Folie eingeschweißt und die Reaktion per Röntgenfilm detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Evaluierung des anti-Chikungunya-Virus IIFTs

Der anti-CHIKV IIFT war der erste kommerziell erhältliche anti-CHIKV Test und sollte mit Seren von CHIKV-infizierten Patienten evaluiert werden. Für die Evaluierung wurden insgesamt vier humane Serumpanels auf anti-CHIKV IgM- und IgG-Antikörper (IgM: n = 246, IgG: n = 207) untersucht. CHIKV-Panel 1 umfasste Seren von CHIKV-Infizierten von der Insel La Réunion und CHIKV-Panel 2 bestand aus Seren von CHIKV-infizierten Reiserückkehrern, die in den Gebieten des Indischen Ozeans gereist waren (siehe Kap. 2.1.8.1). Die CHIKV-spezifischen Antikörper wurde in diesen Panels durch einen *in-house* ELISA (siehe Kap. 2.2.2.2) und einen *in-house* IIFT (siehe Kap. 2.2.2.3) bestimmt und die Ergebnisse mit den Ergebnissen des kommerziellen IIFTs verglichen. Als Negativkontrolle für die Evaluierung des anti-CHIKV IIFTs dienten zwei weitere Serumpanels (siehe Kap. 2.1.8.1). CHIKV-Panel 3 bestand aus deutschen Blutspendern und CHIKV-Panel 4 aus anti-DENV-positiven Seren infizierter Patienten aus Saudi-Arabien und deutschen Reiserückkehrern. Alle Panels wurden mit dem anti-CHIKV IIFT auf IgM- und IgG-Antikörper untersucht.

Abbildung 3.1-1 zeigt das typische Fluoreszenzbild der CHIKV-infizierten Vero E6-Zellen mit einem anti-CHIKV positiven Serum. Die infizierten Zellen zeigen eine veränderte Morphologie, charakterisiert durch viele Zellausläufer.

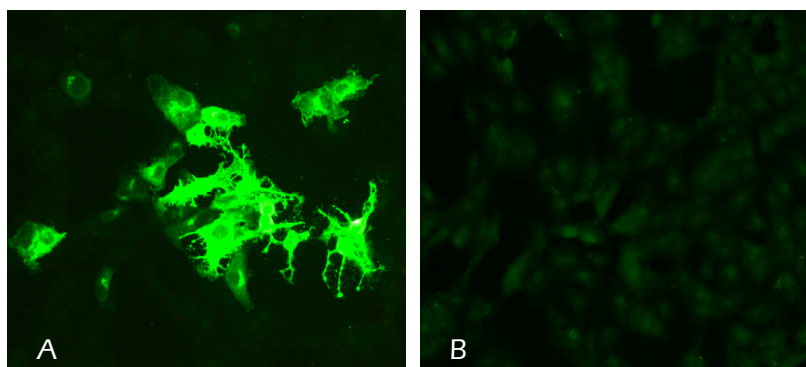


Abbildung 3.1-1: Beispiel eines BIOCHIPs mit CHIKV-infizierten Zellen, inkubiert mit einem Serum eines CHIK-erkrankten Patienten (A) und einer nicht infizierten Person (B), Serumverdünnung 1:100.

Im Panel 1 konnten 78 der 81 anti-CHIKV IgM-positiven Seren (96,3 %) mit dem kommerziellen IIFT bestätigt werden (siehe Tabelle 3.1-1). Die Titer lagen bei 1:10 bis zu > 1:10.000. Drei Seren, die im IgM-ELISA mit grenzwertigen ODs positiv waren, blieben im IIFT negativ. Einer der drei Patienten zeigte zum Zeitpunkt der Blutabnahme erst seit einem Tag klinische CHIK-Symptome und sein Serum war CHIKV-PCR positiv, die Seren der

anderen beiden Patienten waren mehr als zehn Tage nach Beginn der Symptome entnommen worden.

Von den IgG-ELISA-positiven Seren des CHIKV-Panels1 konnten alle Seren mit dem IIFT ebenfalls als positiv detektiert werden, mit Titer-Werten von 1:10 bis zu > 1:10.000. Abbildung 3.1-2 zeigt einen Vergleich der OD-Werte des ELISAs mit dem Titern des IIFTs. Die Trendlinie zeigt einen klaren Anstieg, d.h. bei Seren mit höheren ELISA-Titern wurden ebenfalls höhere IIFT-Titer gemessen.

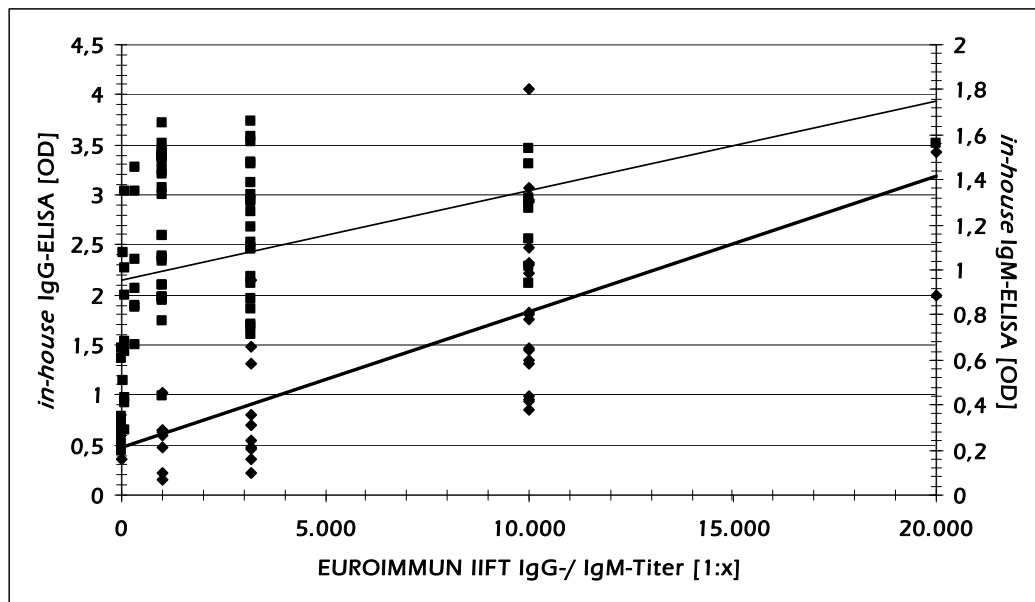


Abbildung 3.1-2: Vergleich der Ergebnisse der Seren von CHIKV-infizierten Patienten von der Insel La Réunion im *in-house* IgM- und IgG-ELISA mit den Ergebnissen im entsprechenden kommerziellen IIFT (Panel 1). Titer > 1:10.000 wurden als 1:20.000 dargestellt. IgM-IIFT/IgM-ELISA (■), IgG-IIFT/IgG-ELISA (◆). Trendlinie: IgM-IIFT/IgM-ELISA (dünn), IgG-IIFT/IgG-ELISA (dick).

Bei der Untersuchung des zweiten CHIKV-Panels auf IgM-Antikörper wurde eine starke Übereinstimmung zwischen dem *in-house* und dem kommerziellen IIFT detektiert (siehe Tabelle 3.1-1). Nur ein Serum mit einem Titer von 1:80 im *in-house* IIFT wurde vom kommerziellen IIFT nicht detektiert.

Allerdings gab es größere Unterschiede in der IgG-Antikörper-Bestimmung. Die positiven Ergebnisse für vier von 47 Seren konnten im kommerziellen IIFT nicht bestätigt werden. Allerdings wurden alle vier Seren in der IgM-IIFT-Bestimmung als positiv detektiert.

Die Resultate der *in-house* IIFTs im Vergleich zu den EUROIMMUN IIFTs sind in der Abbildung 3.1-3 dargestellt. Auch hier zeigt die ansteigende Trendlinie, dass in Seren mit höheren *in-house* IIFT-Titern in der Regel auch höhere Titer im kommerziellen IIFT gemessen wurden.

Bei der Analyse der 100 Kontrollseren deutscher Blutspendern (CHIKV-Panel 3) im kommerziellen anti-CHIKV IIFT waren zwei Seren IgM-reaktiv mit Titern von 1:100. In der IgG-Bestimmung wurden jedoch keine positiven Seren detektiert (siehe Tabelle 3.1-1).

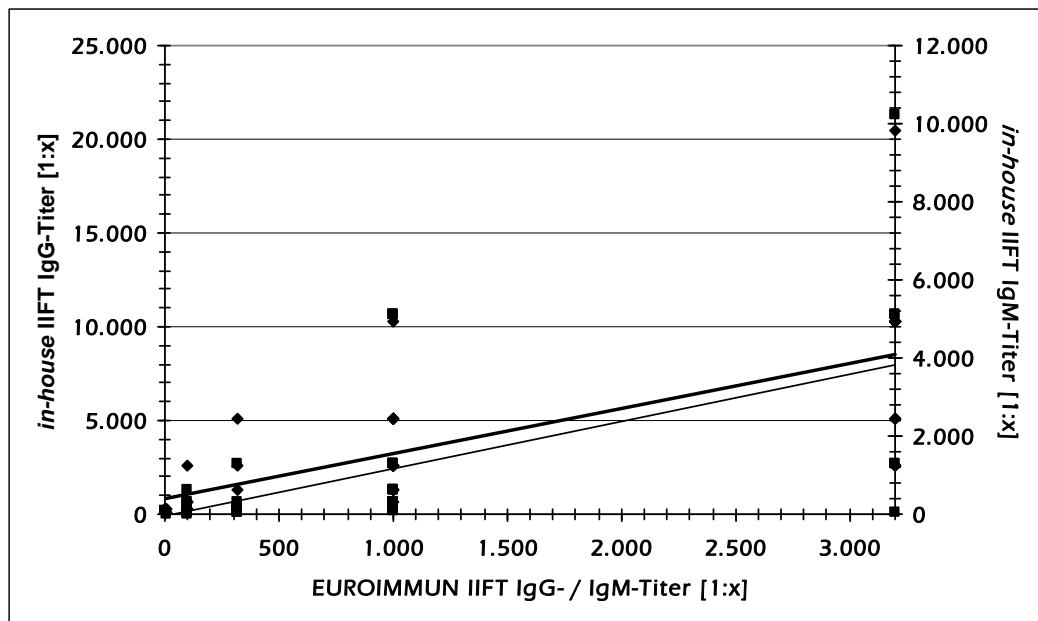


Abbildung 3.1-3: Vergleich der Ergebnisse der Seren von CHIKV-infizierten Reiserückkehrern im *in-house* und im kommerziellen IgM- und IgG-IIFT (Panel 2). IgM-IIFT *in-house*/kommerziell (■), IgG-IIFT *in-house*/kommerziell (◆). Trendlinie: IgM-IIFT *in-house* /kommerziell (dünn), IgG-IIFT *in-house*/kommerziell (dick).

Serum-panel	IgM-positiv im <i>in-house</i> ELISA oder IIFT/getestete Seren [OD/Titerbereich]	IgM-positiv im EUROIMMUN IIFT/getestete Seren [Titerbereich]	IgG-positiv im <i>in-house</i> ELISA oder IIFT/getestete Seren [OD/Titerbereich]	IgG-positiv im EUROIMMUN IIFT/getestete Seren [Titerbereich]
Panel 1	81/81 (100 %) ^a [0,22 - 4,06]	78/81 (96,3 %) [10 - >10 000]	40/40 (100 %) ^a [0,20 - 2,93]	40/40 (100 %) [10 - >10 000]
Panel 2	50/50 (100 %) ^b [20 - 10 240]	49/50 (98 %) [10 - 3 200]	47/47 (100 %) ^b [80 - 20 480]	43/47 (91,5 %) [10 - 3 200]
Panel 3	nd	2/100 (2 %) [100]	nd	0/100 -
Panel 4	nd	0/15 -	nd	0/20 -

Tabelle 3.1-1: Reaktivität der Seren im anti-CHIKV IgM- und IgG-ELISA/IIFT. ^a *in-house* ELISA, ^b *in-house* IIFT, nd: nicht durchgeführt.

Dengue- und Chikungunya-Fieber kommen grundsätzlich in den gleichen geographischen Gebieten vor. Da die Symptome beider Krankheiten kaum voneinander zu unterscheiden sind, kommt der Labordiagnostik ein hoher Stellenwert zu. Daher wurde der anti-CHIKV IIFT mit einem Panel von 15 anti-DENV IgM- und 20 anti-DENV IgG-positiven Seren getestet (CHIKV-Panel 4). Keines dieser anti-DENV positiven Seren war im anti-CHIKV IIFT positiv (siehe Tabelle 3.1-1).

Spezifität, Sensitivität und der positive und negative Vorhersagewert stellen ein Maß für die Güte eines diagnostischen Testes dar. Die Werte der Spezifität und der Sensitivität lagen für den IgM-IIFT bei 98,3 % bzw. 97 %. Der IgG-IIFT zeigte eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 95,4 %. Insgesamt konnten 98,5 % der im IgM-IIFT positiv-getesteten und 96,6 % der negativ-getesteten Patienten bzw. 100 % der im IgG-IIFT positiv-getesteten und 96,8 % der negativ-getesteten Patienten korrekt diagnostiziert werden (siehe Tabelle 3.1-2).

		IgM		IgG	
		Panel 1 - 4		Panel 1 - 4	
		n = 246		n = 207	
		Vorcharakterisierung		Vorcharakterisierung	
		positiv	negativ	positiv	negativ
EUROIMMUN	positiv	127	2	83	0
anti-CHIKV IIFT	negativ	4	113	4	120
Sensitivität		97 %		95,4 %	
(95 % CI)		(92,4 % - 98,8 %)		(88,8 % - 98,2 %)	
Spezifität		98,3 %		100 %	
(95 % CI)		(93,9 % - 99,5 %)		(96,9 % - 100 %)	
positiver Vorhersagewert		98,5 %		100 %	
(95 % CI)		(94,5 % - 99,6 %)		(95,6 % - 100 %)	
negativer Vorhersagewert		96,6 %		96,8 %	
(95 % CI)		(91,5 % - 98,7 %)		(92 % - 98,7 %)	

Tabelle 3.1-2: Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiven Vorhersagewertes für den anti-CHIKV IgM- und IgG-IIFT. 95 % CI: 95 % Konfidenzintervall.

Die im IgM- und IgG-ELISA negativen bzw. grenzwertigen Seren des Panels 1 wurden ebenfalls im IgM- und IgG-IIFT getestet. Es handelte sich um 19 IgM-ELISA-negative und 60 IgG-ELISA-negative Seren. Im IgM-IIFT wurden vier dieser ELISA-negativen Seren (21,1 %) als positiv erkannt. Zwei Jahre zuvor war das gesamte CHIKV-Panel 1 schon mit dem gleichen *in-house* anti-CHIKV IgM- und IgG-ELISA getestet worden. Zwei der vier Seren, die im IgM-IIFT positiv und im zeitnah getesteten IgM-ELISA grenzwertig waren, waren in dem zwei Jahre zuvor durchgeführten IgM-ELISA positiv. Über die zwei Jahre der Lagerung sind demnach die Titer unter die Nachweisgrenze des ELISAs abgesunken. Die anderen beiden IgM-IIFT-positiven Seren waren in beiden IgM-ELISAs als negativ bewertet worden.

Im IgG-IIFT wurden 11 der 60 IgG-ELISA-negativen Seren (18,3 %) als positiv detektiert, mit einem mittleren IIFT-Titer von 1:313 (Titerbereich 1:10 - 1:1000). Diese Seren waren im

zwei Jahre zuvor durchgeführten IgG-ELISA ebenfalls negativ, allerdings zeigten sie in allen durchgeführten IgM-Testen eine positiv Reaktion.

Das CHIKV-Panel 1 ist, wie schon erwähnt, zweimal im Abstand von zwei Jahren mit dem gleichen IgM- und IgG-ELISA getestet worden. Die Seren waren die meiste Zeit bei -20 °C gelagert, sind aber mehrfach aufgetaut und zwischenzeitlich bei 4 °C gelagert worden. Ein genaues Lagerungsprotokoll war jedoch nicht erhältlich.

Bei der ersten IgM-ELISA-Messung wurden 93 Seren als positiv diagnostiziert und zwei Jahre später nur noch 81 dieser Seren. Bei 95 von 100 Seren ist es über die Jahre zu einem Abfall des IgM-Titers gekommen. Die stärkste OD-Abweichung lag bei 3,065. Bei vier Seren zeigte der später durchgeführte IgM-ELISA eine höhere OD und für ein Serum wurde die gleiche OD gemessen. Während die mittlere OD bei der ersten Testung bei 1,94 lag, war sie zwei Jahre später signifikant ($p = < 0,00001$) niedriger bei 0,86, was einem durchschnittlichen Abfall um 55,8 % entspricht.

Die IgG-OD-Werte hingegen fielen weniger stark ab. Die mittlere OD-Abweichung lag bei 0,008. Allerdings wurden auch mit dem später durchgeführten IgG-ELISA weniger Seren als positiv detektiert, nämlich 39 statt 44 Seren.

3.2 anti-Japanisches Encephalitis-Virus IIFT

3.2.1 Evaluierung des anti-Japanische Encephalitis-Virus IIFTs

Der anti-JEV IIFT war der erste kommerziell erhältliche IIFT zur Detektion von anti-JEV Antikörpern. Er sollte zum einen im Vergleich zu drei anderen, kommerziell erhältlichen ELISAs evaluiert werden und zum anderen sollten die Detektion von Kreuzreaktivitäten gegen andere Flaviviren, die Antikörper-Prävalenz in der deutschen Bevölkerung, sowie der Verlauf der Immunantwort nach JE-Impfung mit Hilfe des anti-JEV IIFTs untersucht werden.

Abbildung 3.2-1 zeigt das für Flaviviren typische Fluoreszenzmuster in den infizierten Vero E6-Zellen bei einer Reaktion mit einem anti-JEV-positiven Serum.

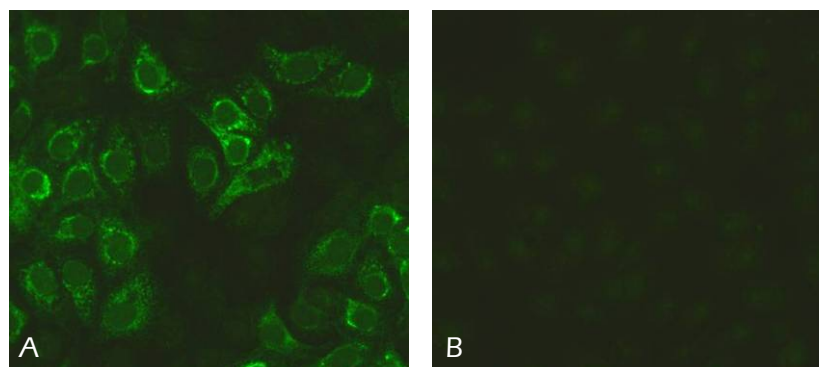


Abbildung 3.2-1: Beispiel eines BIOCHIPs mit JEV-infizierten Zellen, inkubiert mit einem Serum einer JE-geimpften Person (A) und einer nicht geimpften Person (B), Serumverdünnung 1:100.

Die Evaluierung des anti-JEV IIFTs wurde mit einem Panel von Seren durchgeführt, die im Rahmen der Zulassungsstudie für den IXIARO®-Impfstoff von Probanden entnommen wurden (siehe Kap. 2.1.8.2). Die Seren waren mit einem anti-JEV PRNT50 vorcharakterisiert und wurden in dieser Studie mit dem EUROIMMUN anti-JEV IgM-IIFT und zwei verschiedenen IgM-ELISAs, sowie mit dem anti-JEV IgG-IIFT und einem IgG-ELISA getestet. Zur Untersuchung der detektierten Kreuzreaktivitäten wurde zudem ein Panel von anti-DENV-positiven Seren untersucht und die Antikörperprävalenz in der deutschen Bevölkerung wurde mit einem Panel von Blutspenderseren bestimmt (siehe Kap. 2.1.8.2).

3.2.1.1 IgM-Evaluierung

Für die IgM-Evaluierung wurden die Seren der Geimpften mit dem anti-JEV IgM IIFT (siehe Kap. 2.2.2.3.1), dem Panbio Japanese Encephalitis – Dengue IgM Combo ELISA (siehe Kap. 2.2.2.3.3) und dem InBios JE Detect™ IgM-*capture* ELISA (siehe Kap. 2.2.2.3.4) untersucht. Die Evaluierungen der beiden IgM-ELISAs wurden bereits publiziert [195,196].

Insgesamt wurden 78 PRNT50-positive Seren der Zeitpunkte V2, V3, V4 und V5 im IgM-IIFT und dem Panbio IgM-ELISA und dem InBios IgM-ELISA getestet.

Beim Vergleich der Resultate des IgM-IIFTs und der beiden IgM-ELISAs mit den Ergebnissen des PRNT50 zeigte sich, dass im Panbio IgM-ELISA 64 %, im InBios IgM-ELISA 72 % und im IgM-IIFT 65 % der 78 PRNT50-positiven Seren als positiv detektiert wurden (siehe Tabelle 3.2-1).

	anti-JEV IgM		
	Seren positiv im Panbio ELISA/ getestete Seren [Bereich der Panbio Units]	Seren positiv im InBios ELISA/ getestete Seren [ISR Bereich]	Seren positiv im EUROIMMUN IIFT/ getestete Seren [Titerbereich]
PRNT50-positive Seren	50/78 (64 %) [13,7 - 55]	56/78 (72 %) [10,6 - 59,9]	51/78 (65 %) [10 - 320]
PRNT50-negative Seren	nd	nd	0/78 (0 %)

Tabelle 3.2-1: Reaktivität der anti-JEV IgM-Antikörper im ELISA und IIFT. nd: nicht durchgeführt, ISR: InBios immune status Ratio.

Da der PRNT50 jedoch keine Unterscheidung zwischen IgM- und IgG-Antikörpern macht, wurden für die Evaluierung des anti-JEV IgM-IIFTs die IIFT-Ergebnisse direkt mit den Ergebnissen der beiden IgM-ELISAs verglichen und der Test somit im Vergleich zu beiden ELISAs evaluiert. Seren mit grenzwertigen OD-Werten in den ELISAs wurden für diese Evaluierung nicht berücksichtigt. Ein Panel aus 78 PRNT50-negativen Seren diente für die

IgM-IIFT-Evaluierung als Negativkontrolle. Alle Seren dieser Negativkontrolle wurden im IgM-IIFT als negativ diagnostiziert (siehe Tabelle 3.2-1).

		Vorcharakterisierung (Panbio ELISA oder PRNT50) n = 151		Vorcharakterisierung (InBios ELISA oder PRNT50) n = 148	
		positiv	negativ	positiv	negativ
anti-JEV IgM-IIFT	positiv	43	5	47	0
	negativ	7	96	9	92
Sensitivität		86,0 %		83,9 %	
(95 % CI)		(73,8 % - 93,1 %)		(72,2 % - 91,3 %)	
Spezifität		95,1 %		100 %	
(95 % CI)		(88,9 % - 97,9 %)		(96 % - 100 %)	
positiver Vorhersagewert		89,6 %		100 %	
(95 % CI)		(77,8 % - 95,5 %)		(92,4 % - 100 %)	
negativer Vorhersagewert		93,2 %		91,1 %	
(95 % CI)		(86,6 % - 96,7 %)		(83,9 % - 95,2 %)	

Tabelle 3.2-2: Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiven Vorhersagewertes für den anti-JEV IgM-IIFT. 95 % CI: 95 % Konfidenzintervall.

Evaluierung im Vergleich zum Panbio IgM-ELISA

Im Panbio IgM-ELISA zeigten fünf der 78 PRNT50-positiven Seren (6,4 %) grenzwertige OD-Werte und wurden daher nicht in der Evaluierung berücksichtigt. 61 der 73 verbleibenden Seren zeigten im IIFT und im Panbio ELISA übereinstimmende Werte. 43 Seren waren in beiden Testen positiv und 18 Seren in beiden Testen negativ. In zwölf Seren wurden unterschiedliche Ergebnisse gefunden. Fünf dieser zwölf Seren waren im Vergleich zum Panbio ELISA im IIFT falsch-positiv, zeigten jedoch nur niedrige IIFT-Titer von 1:10 - 1:32. Sieben der zwölf Seren waren im IIFT falsch-negativ. Sie hatten im ELISA Panbio Units zwischen 13,8 und 25,9. Im Vergleich zum Panbio IgM-ELISA zeigte der IgM-IIFT eine Spezifität von 95,1 %, eine Sensitivität von 86 % und einen positiven Vorhersagewert von 89,6 % (siehe Tabelle 3.2-2).

Evaluierung im Vergleich zum InBios IgM-ELISA

Im Inbios IgM-ELISA konnten acht der 78 PRNT50-positiven Seren (10,3 %) wegen eines grenzwertigen ELISA-Ergebnisses nicht diagnostiziert werden und wurden in der Evaluierung nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse von 61 Seren stimmten im IgM-IIFT und im InBios ELISA überein. 47 waren positiv und 14 negativ. Allerdings konnten neun ELISA-positive Seren im IIFT nicht als positiv gefunden werden. Die ISR-Werte dieser Seren im

ELISA lagen zwischen 10,6 und 30,1. Insgesamt zeigte die Evaluierung des IgM-IIFTs mit dem InBios IgM-ELISA eine Spezifität von 100 %, eine Sensitivität von 83,9 % und einen positiven Vorhersagewert von 100 % (siehe Tabelle 3.2-2).

Ein Vergleich der Testergebnisse beider ELISAs und des IIFTs ist in der Abbildung 3.2-2 dargestellt. Das Verhältnis der Ergebnisse ist durch den Anstieg der Trendlinie dargestellt.

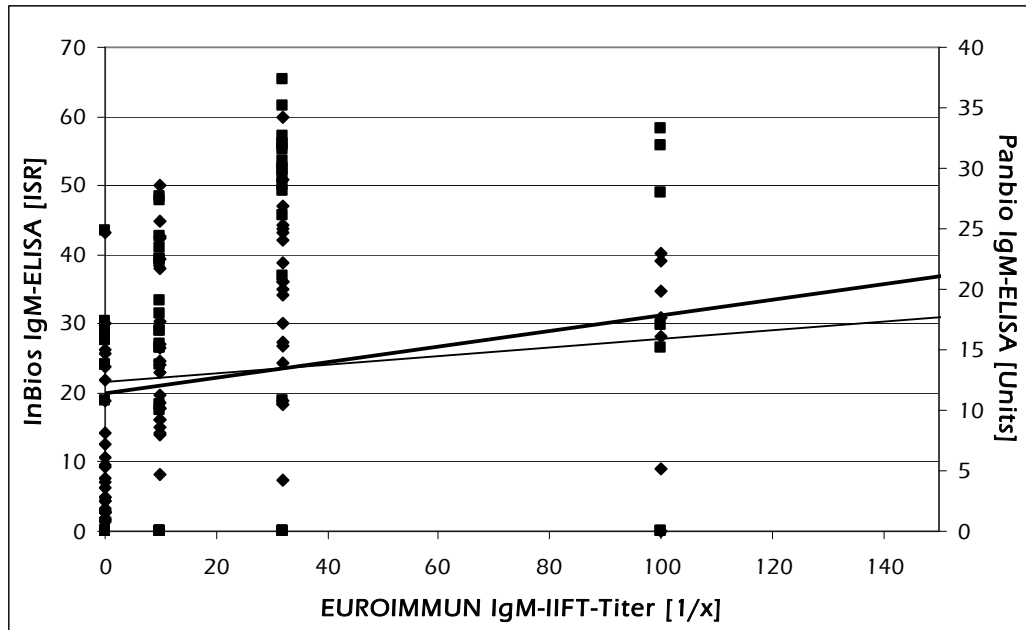


Abbildung 3.2-2: Streudiagramm zur Darstellung der Beziehung der InBios und Panbio IgM-ELISA-Ergebnisse zu den IIFT-Ergebnissen. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde ein IIFT-Ausreißer (1:320) nicht im Diagramm dargestellt. Werte: Panbio IgM-ELISA/IgM-IIFT (■), InBios IgM-ELISA/IgM-IIFT (◆). Trendlinie: Panbio IgM-ELISA/IgM-IIFT (dünn), InBios IgM-ELISA/IgM-IIFT (dick).

3.2.1.2 IgG-Evaluierung

Ursprünglich sollte der IgG-IIFT gegen den InBios JE Detect™ IgG ELISA, den zu diesem Zeitpunkt einzigen verfügbaren kommerziellen IgG-ELISA, evaluiert werden. Allerdings zeigte sich, dass der Inbios IgG-ELISA nur 6,6 % der 91 analysierten PRNT50-positiven Proben des Zeitpunkts V5 als positiv erkannte, während 56 % der PRNT50-positiven Seren als negativ detektiert wurden. Die restlichen 37,4 % der Seren zeigten ein grenzwertiges Ergebnis, wodurch keine klare Aussage getroffen werden konnte (siehe Tabelle 3.2-3).

Mit dem PRNT50 kann zwar, wie schon erwähnt, nicht zwischen IgM und IgG unterschieden werden, allerdings war davon auszugehen, dass am Zeitpunkt V5, also 56 Tage nach Impfung, hauptsächlich IgG-Antikörper vorliegen und daher der PRNT50 zur Evaluierung des IgG-IIFTs verwendet werden konnte. Für die Evaluierung des IgG-IIFTs wurden daher 100 PRNT50-positive Seren vom Zeitpunkt V5 mit den Ergebnissen des IgG-IIFTs verglichen (siehe Tabelle 3.2-3).

97 der 100 Seren zeigten ein positives PRNT50-Ergebnis und 91 dieser 97 PRNT50-positiven Seren (93,8 %) zeigten im IgG-IIFT ein positives Ergebnis mit Titern bis zu 1:1000. Sechs PRNT50-positive Seren waren im IIFT negativ. Der PRNT50-Titerbereich dieser Seren lag zwischen 1:24 und 1:182. Zwei dieser Seren waren am Zeitpunkt V4 im IgG-IIFT positiv und ein Serum zusätzlich im IgM-IIFT positiv, jedoch konnten an V5 keine JEV-spezifischen Antikörper detektiert werden.

Alle 100 am Zeitpunkt V0 und die drei an V5 PRNT50-negativen Seren, wurden auch im IgG-IIFT als negativ bestätigt.

	anti-JEV IgG	
	Seren positiv im InBios ELISA/ getestete Seren [ISR Bereich]	Seren positiv im EUROIMMUN IIFT/ getestete Seren [Titerbereich]
PRNT50-positive Seren	6/91 (7 %) [5,2 - 12,4]	91/97 (94 %) [10 - 1000]
PRNT50-negative Seren	nd	0/103 (0 %)

Tabelle 3.2-3: Reaktivität der anti-JEV IgG-Antikörper im ELISA und IIFT. nd: nicht durchgeführt, ISR: InBios immune status Ratio.

	Vorcharakterisierung (PRNT50)	
	n = 200	
	positiv	negativ
anti-JEV IgG-IIFT	positiv 91	negativ 0
	negativ 6	103
Sensitivität	93,8 %	
(95 % CI)	(87,2 % - 97,1 %)	
Spezifität	100 %	
(95 % CI)	(96,4 % - 100 %)	
positiver Vorhersagewert	100 %	
(95 % CI)	(96 % - 100 %)	
negativer Vorhersagewert	94,5 %	
(95 % CI)	(88,5 % - 97,5 %)	

Tabelle 3.2-4: Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiven Vorhersagewertes für den anti-JEV IgG-IIFT. 95 % CI: 95 % Konfidenzintervall.

Insgesamt zeigte der IgG-IIFT mit diesem Panel im Vergleich zum PRNT50 eine Spezifität von 100 %, eine Sensitivität von 93,8 % und einen positiven Vorhersagewert von 100 % (siehe Tabelle 3.2-4).

Die Abbildung 3.2-3 zeigt das Verhältnis der PRNT50- zu den IIFT-Ergebnissen. Man erkennt eine gewisse Streuung, aber die Trendlinie zeigt einen klaren Anstieg.

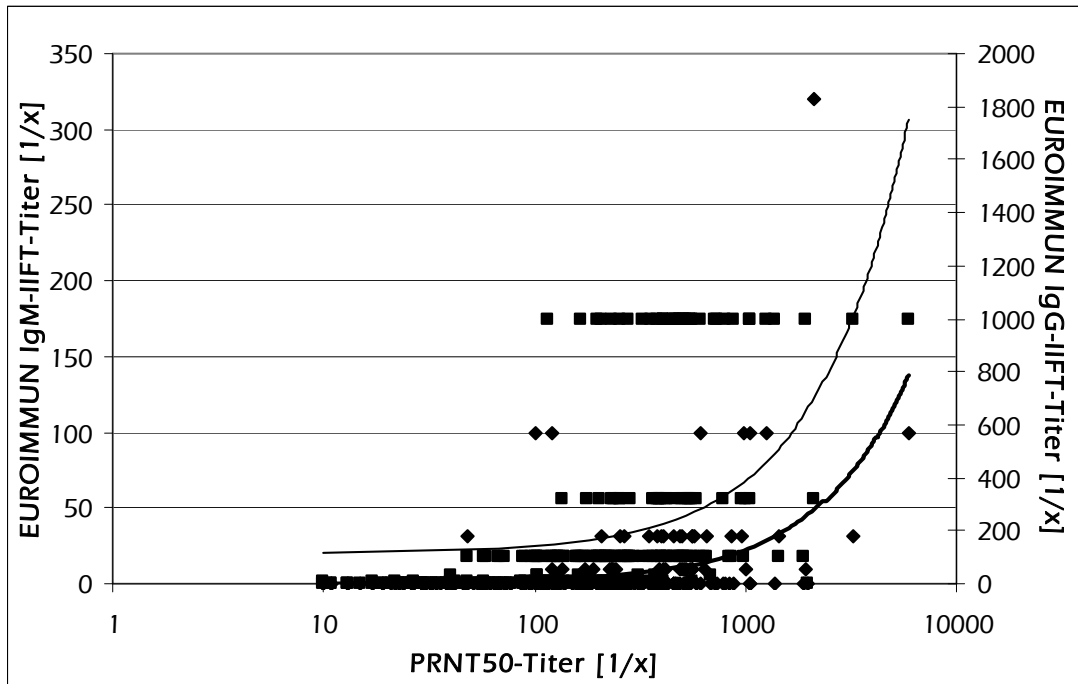


Abbildung 3.2-3: Streudiagramm zum Vergleich der PRNT50- mit den IIFT-Ergebnissen. Werte: IgM-IIFT/PRNT50 (◆), IgG-IIFT/PRNT50 (■). Trendlinie: IgM-IIFT/PRNT50 (dick), IgG-IIFT/PRNT50 (dünn).

3.2.2 Untersuchung der Kreuzreaktivitäten und der Antikörper-Prävalenz

Zusätzlich sollte untersucht werden, wie hoch der Anteil der kreuzreaktiven Antikörper gegen unterschiedliche Flaviviren in den anti-JEV-positiven Seren ist. Dazu wurden zehn, im IgM-IIFT reaktive Seren vom Zeitpunkt V3 und V4 und 20, im IgG-IIFT reaktive Seren vom Zeitpunkt V5 mit dem Flavivirus Profil 2 untersucht (JEV-Panel 2, siehe Kap. 2.1.8.2). Acht der zehn Seren zeigten in der IgM-Bestimmung überhaupt keine Kreuzreaktivität. Zwei Seren zeigten eine Reaktivität gegen Gelbfieber, aber die JEV-Antwort war in beiden Seren die vorherrschende. Sie war eine bzw. zwei Fluoreszenzintensitätsstufen stärker.

Kreuzreaktive IgG-Antikörper wurden in 11 der 20 anti-JEV IgG-positiven Seren gefunden. Die JEV-Antwort war aber ebenfalls stärker als die Antwort gegen andere Flaviviren (zwei Seren zeigten einen Unterschied von einer und neun Seren von zwei oder mehr Fluoreszenzintensitätsstufen).

Zusätzlich wurde ein Panel von 15 anti-DENV IgM- und 20 anti-DENV IgG-positiven Seren (JEV-Panel 3, siehe Kap. 2.1.8.2) auf dem Flavivirus Profil 2 (siehe Kap. 2.2.2.3.2) getestet, um zu untersuchen ob es mit diesem IIFT möglich ist zwischen kreuzreaktiven Antikörpern

gegen JEV oder andere Flaviviren und spezifischen anti-DENV Antikörpern zu unterscheiden (siehe Tabelle 2.2-1). Für IgM wurde eine Kreuzreaktivität gegen andere Flaviviren in vier der 15 Seren gefunden. Drei dieser Seren zeigten eine Kreuzreaktivität gegen JEV. Insgesamt war der anti-DENV IgM-Titer jedoch in allen 15 Seren höher als der IgM-Titer gegen andere untersuchte Flaviviren (drei Seren zeigten einen Unterschied von einer und ein Serum von drei Fluoreszenzintensitätsstufen).

	anti-JEV IgM		
	Seren positiv im Panbio ELISA/ getestete Seren [Bereich der Panbio Units]	Seren positiv im InBios ELISA/ getestete Seren [ISR Bereich]	Seren positiv im EUROIMMUN IIFT/ getestete Seren [Titerbereich]
anti-DENV positive Seren	1/10 (10 %) ^a [21,3]	5/10 (50 %) [10,2 - 17,8]	3/15 (20 %) ^b [10 - 32]
deutsche Blutspenderseren	nd	nd	4/200 (2 %) [10]

	anti-JEV IgG	
	Seren positiv im InBios ELISA/ getestete Seren [ISR Bereich]	Seren positiv im EUROIMMUN IIFT/ getestete Seren [Titerbereich]
anti-DENV positive Seren	17/20 (85 %) [10,5 - 27,1]	20/20 (100 %) ^b [32 - 1000]
deutsche Blutspenderseren	nd	8/197 (4 %) [10 - 32]

Tabelle 3.2-5: Reaktivität der anti-JEV IgM- und IgG-Antikörper im ELISA und IIFT. nd: nicht durchgeführt, ISR: InBios immune status Ratio, ^a Berechnung der JE/Dengue Ratio kann zur Bestimmung der wahrscheinlichen Infektion verwendet werden, ^b Inkubation auf dem Flavivirus Profil 2 kann zur Bestimmung der wahrscheinlichen Infektion verwendet werden.

Zehn der anti-DENV IgM-positiven Seren wurden zudem mit beiden IgM-*capture* ELISAs getestet. Alle Seren wurden mit dem kombinierten JEV and DENV Panbio IgM-ELISA als anti-DENV IgM-positiv diagnostiziert, während im InBios IgM-ELISA fünf der anti-DENV-positiven Seren als anti-JEV positiv, vier als grenzwertig und ein Serum als anti-JEV negativ getestet wurden.

Eine kreuzreaktive anti-JEV IgG-Antwort wurde mit dem Flavivirus Profil 2 in den 20 anti-DENV IgG-positiven Seren gefunden, allerdings war in 80 % der getesteten Seren die anti-

DENV IgG-Antwort höher als die anti-JEV Antwort (12 Seren zeigten einen Unterschied von einer und vier Seren von zwei oder mehr Fluoreszenzintensitätsstufen).

Alle 20 anti-DENV IgG-positiven Seren wurden mit dem InBios JE Detect™ IgG ELISA getestet, wobei 85 % der Seren als anti-JEV IgG-positiv detektiert wurden.

Außerdem wurde die JEV-Antikörperprävalenz in der deutschen Bevölkerung analysiert, um zu untersuchen wie hoch der Anteil von JEV-positiven oder kreuzreaktive Seren ist. Dazu wurde das JEV-Panel 4 (siehe Kap. 2.1.8.2), das aus gesunden deutschen Blutspendern bestand, mit dem anti-JEV IIFT untersucht. Hierbei wurde, wie in Tabelle 3.2-5 zu erkennen, eine Prävalenz von 2 % IgM- bzw. 4,1 % IgG-Antikörpern gegen JEV gefunden.

3.2.3 Untersuchung des Verlaufs der IgM- und IgG-Antwort nach Impfung gegen Japanische Enzephalitis

Mit dem anti-JEV IIFT konnte der Verlauf der IgM- und IgG-Antikörperantwort nach JE-Impfung untersucht werden. Alle PRNT50-positiven Seren wurden mit beiden IIFTs inkubiert. Insgesamt wurden 72,6 % dieser Seren mindestens durch einen IIFT, also entweder durch den IgM- oder den IgG-IIFT als positiv detektiert. Die IgM-IIFT-Titer waren generell immer niedriger als die IgG-IIFT-Titer. Zum Zeitpunkt V3 (28 Tage nach Impfung) waren 11,4 % der PRNT50-positiven Seren IgM-positiv und 18 % IgG-positiv, an V4 lag der Prozentsatz von IgM- und IgG-positiven entsprechend bei 30,6 % und 90,8 % und an V5 bei 15,5 % und 93,8 % (siehe Tabelle 3.2-6).

Zeitpunkt (Tage nach Impfung)	Anzahl der PRNT50- positiven Seren	Anzahl der IIFT-positiven Seren (Prozentsatz)		
		IgM	IgG	IgM und IgG
V2 (7 Tage)	26	1 (3,8 %)	1 (3,8 %)	2 (7,7 %)
V3 (28 Tage)	44	5 (11,4 %)	8 (18 %)	11 (25 %)
V4 (35 Tage)	98	30 (30,6 %)	89 (90,8 %)	89 (90,8 %)
V5 (56 Tage)	97	15 (15,5 %)	91 (93,8 %)	91 (93,8 %)

Tabelle 3.2-6: Prozentsatz der Seren mit im IIFT detektierbaren Antikörpern pro Zeitpunkt.

Innerhalb des analysierten Zeitraums entwickelten 94 % der geimpften Probanden eine mit dem anti-JEV IIFT messbare IgG-Antwort, während nur 33 % eine messbare IgM-Antwort entwickelten. Innerhalb dieser Gruppe der IgM-positiven Probanden war der IgM-Titer bei 94 % der Probanden am Zeitpunkt V4 messbar, während am Zeitpunkt V5 nur noch in 48,5 % der Probanden ein IgM-Titer detektierbar war.

Sechs Impflinge hatten zu allen Zeitpunkten nicht-detektierbare IgG-Titer. Drei dieser sechs Impflinge waren an zumindest zwei Zeitpunkten PRNT50-positiv, zwei waren an zumindest einem Zeitpunkt leicht PRNT50-positiv (bis zu 1:54) und ein Proband hat nach Impfung keinen messbaren PRNT50-Titer entwickelt. Alle sechs Probanden zeigten ebenfalls ausschließlich negative IgM-IIFT-Resultate.

In 81,8 % der Impflinge mit einer detektierbaren IgM-Antwort wurden IgM- und IgG-Antikörper gleichzeitig nachweisbar. Nur in 12,1 % der Impflinge war die IgM-Antwort vor der IgG-Antwort detektierbar. Der PRNT50-Titerbereich der Seren, die im IgM-IIFT als negativ detektiert wurden, lag zwischen 1:10 und 1:1965 (n = 216, geometrischer Mittelwert 1:133) und der Bereich der Seren, die im IgG-IIFT als negativ gemessen wurden, lag zwischen 1:10 und 1:317 (n = 77, geometrischer Mittelwert 1:52).

In Abbildung 3.2-4 sind einige typische Verläufe von IgM- und IgG-Titern im Vergleich zu den jeweiligen PRNT50-Titern dargestellt. Der Verlauf der Immunantwort von Impfling Nr. 1 zeigt parallel einen Abfall der PRNT50- und IgG-Titer. Wie auch in den meisten analysierten Proben, konnten auch bei diesem Impfling keine IgM-Titer detektiert werden.

In den Proben des Impflings Nr. 2 konnten beide Antikörperklassen gefunden werden. IgM war bei diesem Probanden vor IgG detektierbar, wie auch in 12,1 % der Impflinge mit einer messbaren IgM-Antwort. Trotz eines ansteigenden PRNT50-Titers fielen die IgM- und/oder IgG-Titer über die Zeit ab. Dieser Effekt war in 7 % aller Impflinge zu finden.

In 36,4 % der Impflinge fielen IgM und IgG gemeinsam ab, wie auch bei Impfling Nr. 3. In diesem Fall zeigte auch der PRNT50-Titer einen entsprechenden Verlauf. Ein simultaner Verlauf aller messbaren Titer konnte ebenfalls in 40 % der analysierten Impflinge beobachtet werden; in 26 % der Fälle fielen der PRNT50-, IgM- und/oder IgG-Titer gemeinsam ab und in 14 % stiegen sie gemeinsam an. Generell fiel in 66 % der Probanden der PRNT50-Titer gegen Ende der Studie wieder ab. In den Impfungen Nr. 4 und Nr. 5 wurde ein Abfall des IgM-Titers detektiert während der IgG-Titer konstant blieb. Ein entsprechender Verlauf wurde auch in 30,3 % aller Impflinge gefunden. Bei 12,1 % der Impflinge, und ebenfalls in Impfling Nr. 6, fiel der IgM-Titer ab, während der IgG-Titer anstieg.

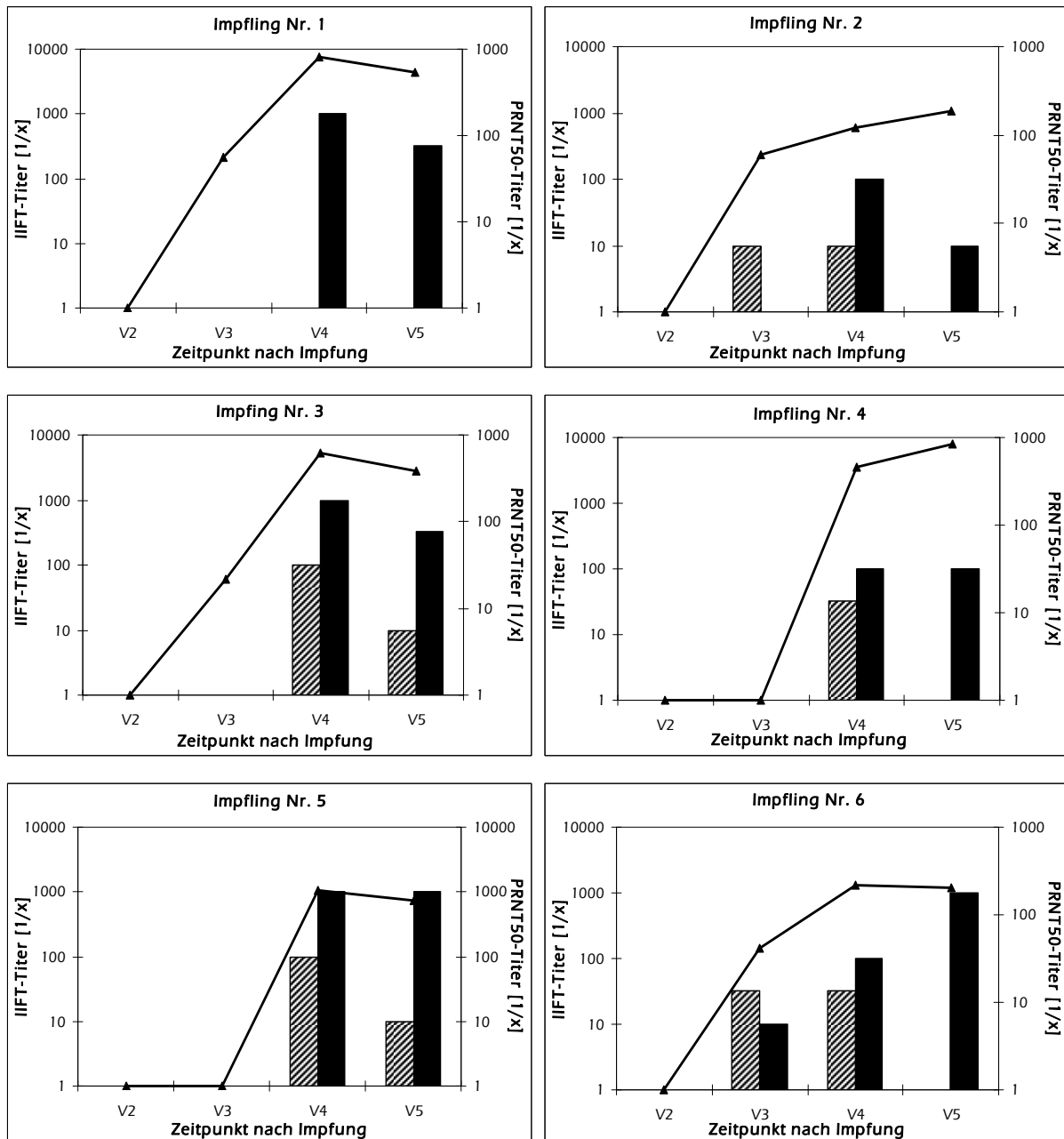


Abbildung 3.2-4: Exemplarische Verläufe des IgM-, IgG- und neutralisierenden Antikörpertiters, bestimmt mit dem IgM- und IgG-IIFT sowie dem PRNT50. Werte: IgM-IIFT-Titer (gestreifte Säulen), IgG-IIFT-Titer (ausgefüllte Säulen), PRNT50-Titer (Linie).

3.2.4 Sequenzierung und phylogenetische Untersuchung des Japanische Encephalitis-Virus Stammes

Der für die Produktion des anti-JEV IIFT verwendete JEV-Stamm des Robert Koch-Instituts war zuvor nicht näher charakterisiert und sollte zusätzlich phylogenetisch untersucht werden, um nähere Informationen über diesen Stamm zu erhalten. Dazu wurde das E-Protein des JEV amplifiziert (1403 bp), sequenziert und eine phylogenetische Analyse durchgeführt bei der die Sequenz des E-Proteins des RKI JEV-Stammes in den von Schuh *et*

al. 2010 [197] publizierten, phylogenetischen Baum eingeordnet wurde (siehe Abbildung 3.2-5).

Der verwendete JEV-Stamm ähnelt am stärksten dem Stamm 691004 aus Sri Lanka (Genebank Zugangsnr. Z34097), sowie dem JEV Nakayama Referenzstamm (Genebank Zugangsnr. EF571853).

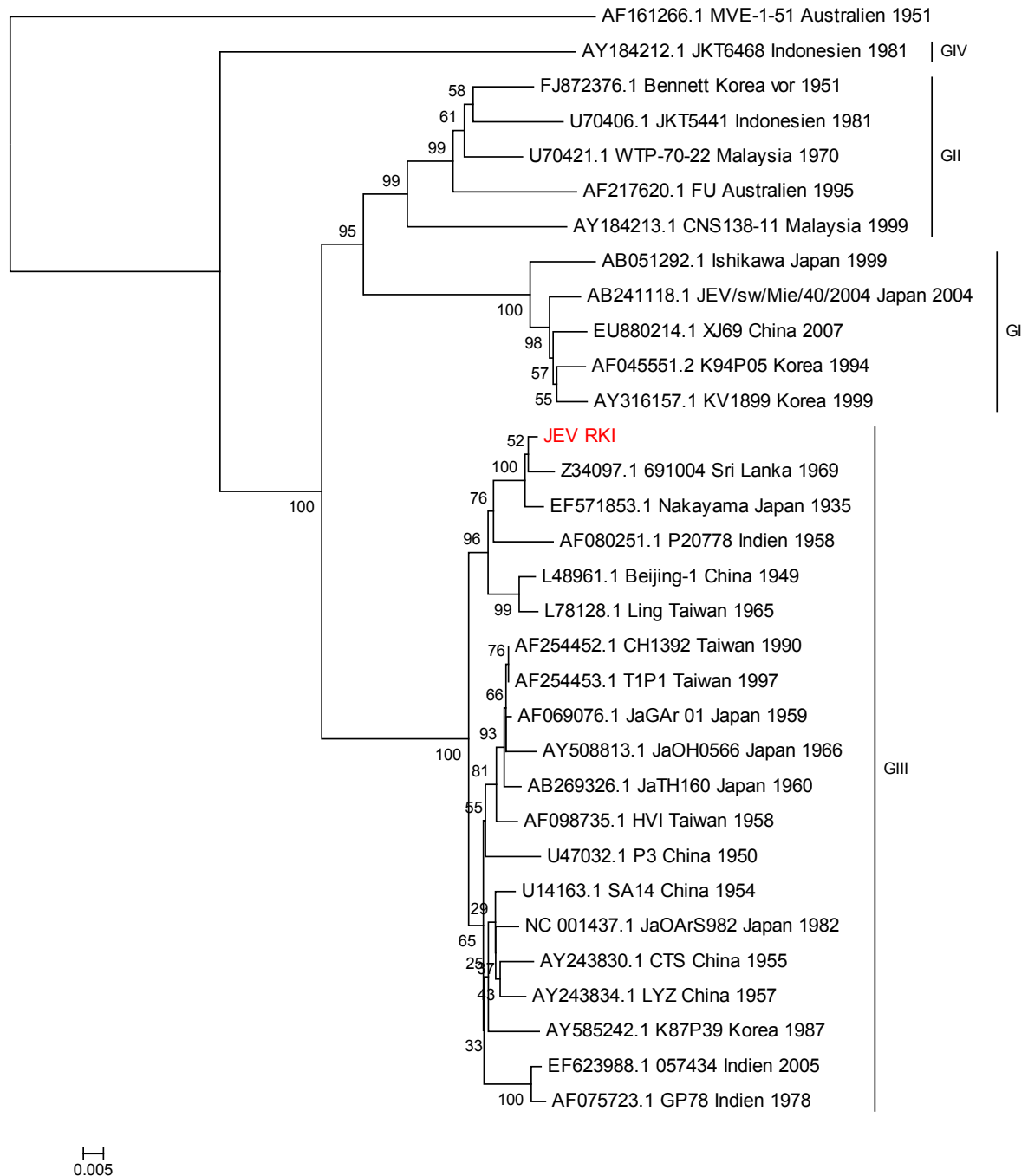


Abbildung 3.2-5: Der phylogenetische Baum der E-Protein-Nukleotidsequenzen der verschiedenen Stämme wurde mittels des Neighbour-joining Verfahrens ermittelt. Die dargestellten *Bootstrap*-Werte beruhen auf einer 1000fachen Wiederholung. Die Länge der horizontalen Äste ist ein Maß für die Nukleotidsubstitutionen pro Sequenzstelle (siehe Legende am linken unteren Rand). Die Zugehörigkeit zu den Genotypen (GI – GIV) ist rechts neben dem phylogenetischen Baum dargestellt.

3.3 anti-Dengue-Virus Mosaik IIFT

3.3.1 Evaluierung des anti-Dengue-Virus IIFTs

Der anti-DENV Mosaik IIFT ist der einzige kommerzielle Test bei dem alle vier DENV-Serotypen verwendet werden und einzelne Titer für die verschiedenen Serotypen ermittelt werden können (siehe Abbildung 3.3-1). Er sollte daher mit zwei verschiedenen Serumpanels hinsichtlich der Fähigkeit evaluiert werden die einzelnen Serotypen serologisch zu unterscheiden.

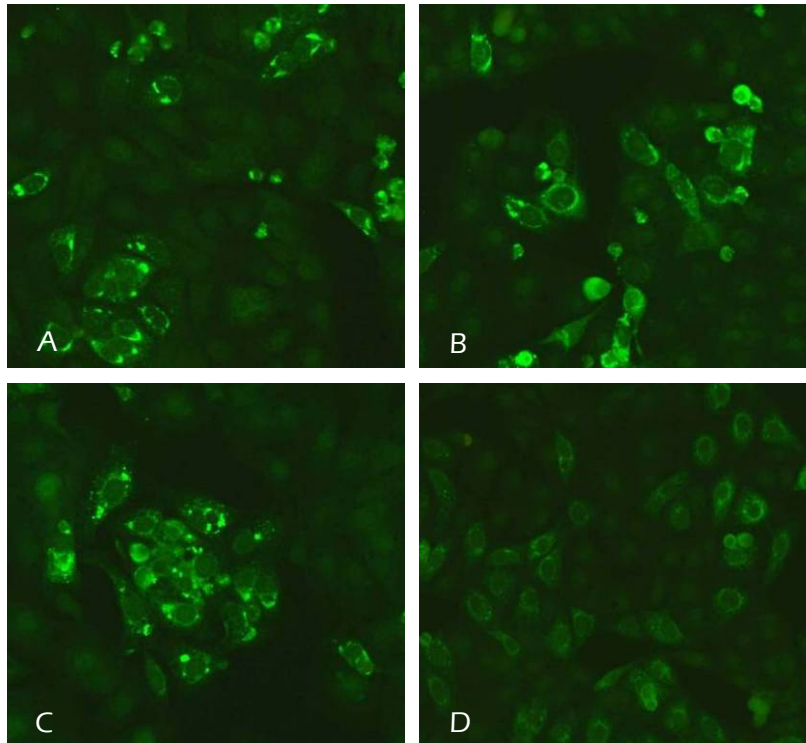


Abbildung 3.3-1: Beispiel eines BIOCHIPs mit DENV-1- (A), DENV-2- (B), DENV-3- (C) und DENV-4- (D) infizierten Zellen, inkubiert mit einem Serum jeweils eines Infizierten. Serumverdünnung 1:100.

Für diese Evaluierung wurde je ein Panel von spanischen Reiserückkehrern (Panel 1, siehe Kap. 2.1.8.3), sowie von französischen Reiserückkehrern und Einwohnern der französischen Überseegebiete (Panel 2, siehe Kap. 2.1.8.3) mit dem anti-DENV IIFT untersucht. Bei beiden Panels war der DENV-Serotyp, der die Infektion ausgelöst hat, zuvor per PCR bestimmt worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3-1 dargestellt.

Insgesamt zeigten sich im IgM-IIFT wesentlich weniger Kreuzreaktivitäten als im IgG-IIFT. Das Ergebnis des IgM-IIFTs wurde demnach bei Differenzen in beiden Tests stärker bewertet als das des IgG-IIFTs. Nur bei den Seren Nr. 11 und 15, bei denen im IgG-IIFT ein einzelner stark reaktiver Serotyp gefunden wurde und im IgM-IIFT mehrere Serotypen gleich hohe Titer hatten, wurde der Serotyp des IgG-IIFTs zur Serotypisierung verwendet.

Im Panel 1 konnte bei sieben von zwölf Seren (58,3 %) der krankheitsauslösende Serotyp ermittelt werden. Bei einem Serum (8,3 %) wurde ein anderer Serotyp detektiert. Bei

weiteren vier Seren (33,3 %) zeigten mehrere Serotypen eine gleich starke Reaktion und eine Serotypisierung war daher nicht möglich. Allerdings war der per PCR bestimmte Serotyp jeweils unter den detektierten Serotypen.

	Herkunft	Zeitpunkt nach Beginn der Symptome [Tage]	Serotyp per PCR	IgM-IIFT	IgG-IIFT	richtiger Serotyp insgesamt	anderer Serotyp insgesamt	
				DENV-Serotyp mit höchstem Antikörper-Titer	DENV-Serotyp mit höchstem Antikörper-Titer			
Panel 1	1	Kenia	19	DENV-1	1 / 2	1 / 2	-	
	2	Dom. Rep.	-	DENV-1	1	1 / 2	DENV-1	
	3	Indonesien	9	DENV-1	1 / 2	1 / 2 / 3	-	
	4	Indien	20	DENV-2	2	2	DENV-2	
	5	Indien	18	DENV-2	2	1 / 2	DENV-2	
	6	Sri Lanka	11	DENV-2	2	2	DENV-2	
	7	Indien	23	DENV-2	2	2	DENV-2	
	8	Puerto Rico	48	DENV-3	2 / 3	1 / 2 / 3	-	
	9	Venezuela	20	DENV-3	1 / 2 / 3	1 / 2 / 3	-	
	10	Indien	18	DENV-3	1	1 / 2 / 3 / 4		DENV-1
	11	Thailand	40	DENV-3	2 / 3	3	DENV-3	
	12	Nicaragua	49	DENV-4	4	1 / 2 / 3 / 4	DENV-4	
Panel 2	13	Reunion	2	DENV-1	1	1	DENV-1	
	14	Reunion	-	DENV-1	1	1 / 3	DENV-1	
	15	Seychellen	4	DENV-1	1 / 2 / 3	2		DENV-2
	16	ex-Madagaskar	5	DENV-1	-	1 / 2 / 3 / 4	-	
	17	ex-Tahiti	3	DENV-1	1 / 2	1 / 2 / 3	-	
	18	ex-Mexiko	4	DENV-1	1 / 2	-	-	
	19	ex-Dom. Rep.	6	DENV-1	1 / 2	1 / 2	-	
	20	ex-Indonesien	9	DENV-1	1	1 / 2 / 3	DENV-1	
	21	Martinique	5	DENV-2	2	2 / 3 / 4	DENV-2	
	22	Guadeloupe	2	DENV-2	-	1 / 2 / 3 / 4	-	
	23	Guadeloupe	-	DENV-2	1 / 2 / 3	1 / 2 / 3 / 4	-	
	24	Guadeloupe	5	DENV-2	1 / 2 / 3	1 / 2 / 3 / 4	-	
	25	Guadeloupe	-	DENV-2	-	1 / 2 / 3 / 4	-	
	26	Guadeloupe	5	DENV-2	3 / 4	1 / 2 / 3 / 4	-	
	27	ex-Kambodscha	4	DENV-3	3	3	DENV-3	
	28	ex-Thailand/ Indonesien	3	DENV-3	3	2	DENV-3	

Tabelle 3.3-1: Untersuchung der DENV-Panels 1 und 2 mit dem EUROIMMUN anti-DENV IIFT. Reiserückkehrer wurden mit dem Vorsatz „ex-“ gekennzeichnet; -: nicht vorhanden; fettgedruckt: DENV-Serotyp entsprechend der PCR-Vorcharakterisierung; rot: DENV-Serotyp, der nicht mit dem Serotyp per PCR übereinstimmt.

Bei der Analyse des Panels 2 stimmte bei nur 6 von 16 Seren (37,5 %) der per IIFT und der per PCR bestimmte Serotyp überein. Die Seren des Panels 2 wurden allerdings alle durchweg sehr früh nach Infektion entnommen, zeigten aber trotzdem einen zum Teil sehr hohen IgG-Titer. Dies deutet auf das Vorliegen einer Sekundärinfektion hin [92,198]. Daher wurden die Seren zusätzlich mit einem Aviditäts-ELISA, beruhend auf einem IgG-

ERGEBNISSE

Herkunft	Zeitpunkt nach Beginn der Symptome [Tage]	Serotyp per PCR	IgM-IIFT			IgG-IIFT			Aviditäts-ELISA			Deutung
			maximale Titer aller vier Serotypen	DENV-Serotyp höchstem Titer	maximale Titer aller vier Serotypen	DENV-Serotyp mit höchstem Titer	ELISA [normierte OD]	ELISA (mit Harnstoff) [normierte OD]	Aviditätsquotient [%]			
13 Reunion	2	DEN-1	32 - 100	1	100	1	1	0,188	0,141	(74,9)	(Sekundärinfektion)	
14 Reunion	-	DEN-1	10 - 320	1	10 - 100	1	1	0,218	0,162	(74,4)	(Sekundärinfektion)	
15 Seychellen	4	DEN-1	100	1/2/3	32.000 - 100.000	2	2	2,588	2,157	83,3	Sekundärinfektion	
16 ex-Madagaskar	5	DEN-1	0	-	> 10.000	1/2/3/4	1/2/3/4	1,853	1,324	71,5	Sekundärinfektion	
17 ex-Tahiti	3	DEN-1	32 - 100	1/2	1000	1/2/3	1/2/3	0,648	0,337	(51,9)	(Sekundärinfektion)	
18 ex-Mexiko	4	DEN-1	10 - 100	1/2	0	-	-	nd	nd	-	Primärinfektion	
19 ex-Dom. Rep.	6	DEN-1	32 - 320	1/2	10 - 100	1/2	1/2	0,214	0,127	(59,4)	(Sekundärinfektion)	
20 ex-Indonesien	9	DEN-1	100 - 1000	1	100 - 1000	1/2/3	1/2/3	0,487	0,175	(36,0)	(Primärinfektion)	
21 Martinique	5	DEN-2	320	2	3200 - 10.000	2/3/4	2/3/4	1,312	0,758	57,7	Sekundärinfektion	
22 Guadeloupe	2	DEN-2	0	-	1000	1/2/3/4	1/2/3/4	0,813	0,469	(57,7)	(Sekundärinfektion)	
23 Guadeloupe	-	DEN-2	10 - 100	1/2/3	> 10.000	1/2/3/4	1/2/3/4	2,607	1,820	69,8	Sekundärinfektion	
24 Guadeloupe	5	DEN-2	100	1/2/3	> 10.000	1/2/3/4	1/2/3/4	2,910	1,978	68,0	Sekundärinfektion	
25 Guadeloupe	-	DEN-2	0	-	32.000	1/2/3/4	1/2/3/4	2,270	1,686	74,3	Sekundärinfektion	
26 Guadeloupe	5	DEN-2	10 - 32	3/4	100.000	1/2/3/4	1/2/3/4	2,125	1,854	87,2	Sekundärinfektion	
27 ex-Kamboodscha	4	DEN-3	10 - 100	3	100 - 1000	3	3	0,201	0,146	(72,4)	(Sekundärinfektion)	
28 ex-Thailand/Indonesien	3	DEN-3	10 - 32	3	320 - 3200	2	2	1,099	0,606	55,2	Sekundärinfektion	

Tabelle 3.3-2: Ergebnisse des Aviditäts-ELISAs im Vergleich zu den Ergebnissen der anti-DENV IIFT-Inkubation. ELISA-Ergebnisse oberhalb des *Cut-offs* sind fettgedruckt, Aviditätsquotient und Deutung von ELISA-Ergebnissen unterhalb des *Cut-offs* in Klammern. Reiserückkehrer wurden mit dem Vorsatz „ex-“ gekennzeichnet; -: nicht vorhanden; fettgedruckt: DENV-Serotyp entsprechend der PCR-Vorcharakterisierung bzw. positives ELISA-Ergebnis; rot: DENV-Serotyp, der nicht mit dem Serotyp per PCR übereinstimmt.

ELISA der Firma Omega, auf das Vorliegen hoch-aviden Antikörper und somit einer möglichen Sekundärinfektion untersucht (siehe Tabelle 3.3-2).

Zunächst zeigte sich, dass die IgG-IIFT-Bestimmung wesentlich sensitiver war als die IgG-ELISA-Bestimmung. Nur 8 von 15 Seren (53,3 %), die im IIFT positiv waren, lagen auch im ELISA über dem *Cut-off*. Für die Bestimmung des Aviditätsquotienten wurden jedoch auch die ODs unterhalb des *Cut-offs* berücksichtigt.

Die Auswertung der ELISA-Ergebnisse ergab, dass es sich bei Panel 2 bei 14 von 16 Seren (87,5 %) höchstwahrscheinlich um Seren nach Sekundärinfektion handelte. Serum Nr. 20 zeigte eine geringe IgG-Avidität im ELISA und stammt daher mit großer Sicherheit aus einer Primärinfektion. Serum Nr. 18 wurde nicht im IgG-ELISA getestet, da keine IgG-Antikörper im IIFT messbar waren und es sich demnach ebenfalls höchstwahrscheinlich um eine Primärinfektion handelt.

Bei dem Serum Nr. 15 und dem Serum Nr. 28 wurde im IgG-IIFT ein anderer Serotyp als in der PCR bestimmt. Bei Serum Nr. 28 hatte das keine Auswirkung auf die Serotypisierung des Serums, da der IgM-IIFT eine deutliche Reaktion nur mit DENV-3 zeigte und das IgM-Ergebnis stärker bewertet wurde. Bei Serum Nr. 15 jedoch gab es kein eindeutiges IgM-Ergebnis. Das Ergebnis des Aviditäts-ELISAs deutet jedoch darauf hin, dass beide Seren höchstwahrscheinlich Sekundärinfektionen sind und der per IgG-IIFT detektierte Serotyp den Serotyp der Primärinfektion darstellt.

Wenn man nun bei den Seren, die höchstwahrscheinlich aus einer Sekundärinfektion stammen, nur die IgM-reaktiven betrachtet, so konnten fünf von elf Seren (45,5 %) per IgM-IIFT richtig serotypisiert werden. Drei der Seren aus einer Sekundärinfektion, zeigten keinen IgM-Titer.

Betrachtet man insgesamt bei Panel 1 und Panel 2 nur die IgM-Bestimmung, so konnten 13 der 25 IgM-reaktiven Seren (52 %) mit dem anti-DENV IIFT richtig serotypisiert werden. Bei weiteren zwölf Seren (48 %) zeigten mehrere Serotypen eine gleich starke Fluoreszenz und eine Differenzierung war daher nicht möglich. Bei elf dieser Seren (44 %) stimmte jedoch der mittels PCR bestimmte Serotyp mit einem der stark reaktiven Serotypen überein.

Beide DENV-Panels wurden zur weiteren Analyse zusätzlich mit dem rekombinanten anti-DENV NS1 Mosaik IIFT inkubiert (siehe Kap. 3.6.2.2).

3.3.2 Sequenzierung und phylogenetische Untersuchung der verwendeten Dengue-Virus-Stämme

Die für den anti-DENV IIFT verwendeten vier DENV-Serotypen des Robert Koch-Instituts waren nicht zuvor näher charakterisiert und sollten daher phylogenetisch untersucht werden.

Für die phylogenetische Einordnung der DENV-Stämme wird im Rahmen von epidemiologischen Studien in der Regel ein 220 bp-Fragment am Übergang des E- und des NS1-Proteins verwendet [199,200]. Dieses Fragment wurde von Pranav Patel im Rahmen einer Diplomarbeit an der Technischen Universität Berlin für alle vier Serotypen amplifiziert und phylogenetisch analysiert (Daten nicht gezeigt). Der DENV-1 Stamm ließ sich innerhalb des amerikanischen/afrikanischen Genotyps in die Linie Amerika-1 einordnen und ist genetisch nahe verwandt mit den Stämmen CESARA-1 Costa Rica 1993 und NI04VI04-Nicaragua 1996 (Genebank Accession Nr. AY153755 und DQ016656). Die DENV-2 und DENV-3 Stämme clusterten jeweils mit den Sequenzen des thailändischen Genotyps. Der DENV-2-Stamm ähnelt den Stämmen D87-279 bzw. D87-1283 Thailand 1987 (Genebank Accession Nr. U34945 und U34938) und WI37VI04 Thailand 2003 und der DENV-3-Stamm den Stämmen D88-086 Thailand 1988 und D89-273 Thailand 1989 (Genebank Accession Nr. AY145713 und AY145715). Der DENV-4 Stamm gehört laut dieser phylogenetischen Analyse zum indonesischen Genotyp und ähnelt Stamm 1554-Mexico1985 und D4M.7-Martinique 1982 (Genebank Accession Nr. DQ341214 und AY152352S4).

3.4 anti-Sandfliegen-Fieber-Viren Mosaik IIFT

3.4.1 Evaluierung des anti-Sandfliegen-Fieber-Viren Mosaik IIFTs

Der anti-SFV Mosaik IIFT handelt es sich um den ersten kommerziellen Test, der vier verschiedene europäische SFV-Stämme verwendet. Er besteht aus vier BIOCHIPS mit den SFV-Stämmen TOSV, SFSV, SFNV und CYPV. Abbildung 3.4-1 zeigt das typische „wolkige“ Fluoreszenzmuster der anti-SFV positiven Seren mit den infizierten Vero E6-Zellen.

Der anti-SFV Mosaik IIFT sollte mit weiteren kommerziellen anti-TOSV Testen verglichen werden. Da zuvor Hinweise auf regelmäßige SFV-Infektionen in der Türkei entdeckt worden waren, wurden in der Türkei im Rahmen einer Blutspenderuntersuchung Seren auf dem anti-SFV Mosaik IIFT getestet. 132 Seren, die mit dem anti-SFV IIFT als IgG-positiv detektiert wurden, wurden dem RKI für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Aufgrund der IIFT-Ergebnisse der Seren mit den verschiedenen SFV-Substraten wurden zunächst folgenden Panel gebildet: Panel T (46 anti-TOSV-positive Seren), Panel C (7 anti-CYPV-positive Seren), Panel N (11 anti-SFNV-positive Seren), Panel S (18 anti-SFSV-positive Seren), Panel NT (25 anti-TOSV- und SFNV-positive Seren), Panel SC (25 anti-SFSV- und CYPV-positive Seren).

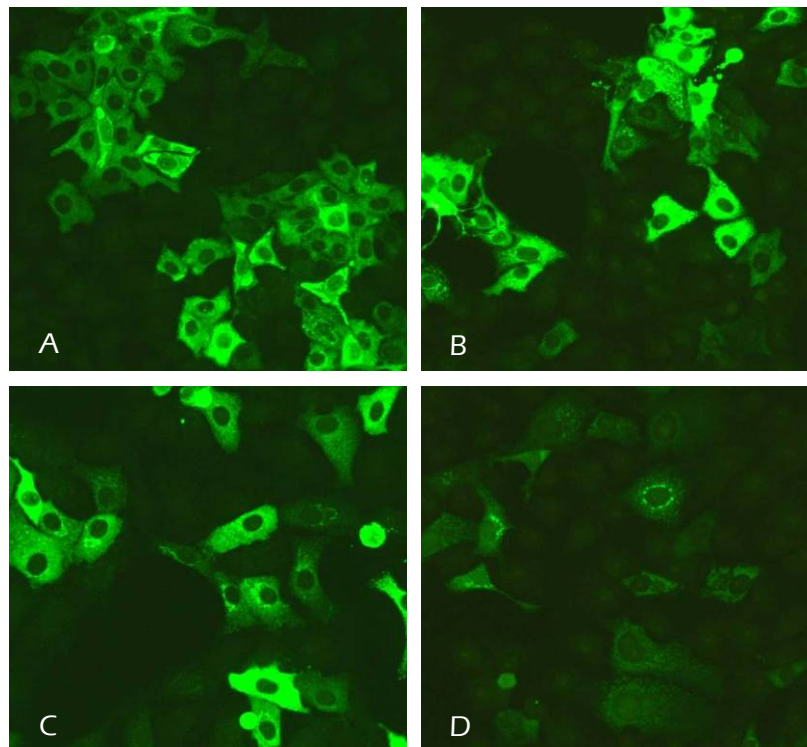


Abbildung 3.4-1: Beispiel eines BIOCHIPs mit TOSV-infizierten Zellen, inkubiert mit dem Serum eines TOSV-Infizierten (A), SFSV-infizierten Zellen, inkubiert mit dem Serum eines SFSV-Infizierten (B), SFNV-infizierte Zellen, inkubiert mit dem Serum eines SFNV-Infizierten (C), CYPV-infizierte Zellen, inkubiert mit dem Serum eines CYPV-Infizierten (D). Serumverdünnung 1:100.

Alle diese Seren wurden im Anschluss mit dem Enzywell Toscana Virus IgG/IgM ELISA der Firma DIESSE (siehe Kap. 2.2.2.5.2) und dem recomLine Bunyavirus IgM/IgG Blot der Firma Mikrogen (siehe Kap. 2.2.2.5.3) getestet, um die Übereinstimmungen der Ergebnisse der verschiedenen Tests zu analysieren.

Der anti-TOSV IgG-ELISA zeigte insgesamt eine wesentlich geringere Sensitivität als das anti-SFV IgG-IIFT (siehe Tabelle 3.4-1). Die stärkste Reaktivität des ELISA konnte im Panel NT gefunden werden, also den Seren, die im IIFT mit dem SFNV- und dem TOSV-Substrat reagiert hatten. In diesem Panel waren 28 % der Seren ELISA-positiv und zusätzlich reagierten 16 % grenzwertig. Im Panel T, das im IIFT nur mit dem TOSV-Substrat reagierte, wurden keine Seren im anti-TOSV ELISA als positiv detektiert und nur 10,9 % als grenzwertig.

Die Sensitivität des anti-TOSV IgG-Blot war höher. Auch bei diesem Test konnte die stärkste Reaktivität im Panel NT gefunden werden. 98 % der Seren wurden als positiv detektiert. Im Panel T hingegen waren es ebenfalls weniger (30,4 %).

Allerdings konnte im IIFT im Panel NT im Vergleich zum Panel T ebenfalls eine höhere mittlere Fluoreszenzstärke beobachtet werden, d.h. in diesen Panels wurde im Mittel mit dem IIFT eine höhere Antikörperkonzentration gegen das TOSV-Substrat gefunden ($p = 0,0005$). Auch beim Panel SC im Vergleich zum Panel S lag die mittlere Fluoreszenzstärke signifikant höher ($p = 0,0003$). Beim Vergleich aller gemessenen

ERGEBNISSE

Fluoreszenzstärken zeigte sich insgesamt, dass die Fluoreszenzstärken in den Seren, die nur mit einem Substrat reagierten, signifikant niedriger lagen als die Fluoreszenzstärken in Seren, die mit mehr als einem Substrat reagierten ($p < 0,00001$).

SFV-Panels	Betrachtetes Substrat des anti-SFV IIFTs*/ verwendeter Test	Resultat	Anzahl positiver Seren	Anteil positiver Seren	Titerbereich/ Ratiobereich/ Bandenstärke	Mittlere Fluoreszenz-Stärke ⁺ (Titer)
Panel N (n = 11)	anti-SFNV IIFT	positiv	11	100 %	1:100 - 1:1000	1,7 (1:320)
	anti-TOSV ELISA	positiv	0			
		equiv.	0			
	anti-TOSV Blot	positiv	9	81,8 %	1 - 2	
Panel C (n = 7)	anti-CYPV IIFT	positiv	7	100 %	1:100 - 1:320	1,4 (1:100)
	anti-TOSV ELISA	positiv	0			
		equiv.	1	14,3 %	0,8	
	anti-TOSV Blot	positiv	0			
Panel S (n = 18)	anti-SFSV IIFT	positiv	18	100 %	1:100 - 1:1000	1,7 (1:320)
	anti-TOSV ELISA	positiv	1	5,6 %	1,3	
		equiv.	1	5,6 %	1,2	
	anti-TOSV Blot	positiv	3	16,7 %	1	
Panel T (n = 46)	anti-TOSV IIFT	positiv	46	100 %	1:100 - 1:1000	1,9 (1:320)
	anti-TOSV ELISA	positiv	0			
		equiv.	5	10,9 %	0,8 - 0,9	
	anti-TOSV Blot	positiv	14	30,4 %	1 - 3	
Panel NT (n = 25)	anti-SFNV IIFT	positiv	25	100 %	1:100 ->1:1000	2,2 (1:320)
	anti-TOSV IIFT	positiv	25	100 %	1:100 ->1:1000	2,6 (1:1000)
	anti-TOSV ELISA	positiv	7	28 %	1,3 - 3,7	
		equiv.	4	16 %	0,9 - 1,1	
	anti-TOSV Blot	positiv	24	98 %	2 - 3	
Panel SC (n = 25)	anti-SFSV IIFT	positiv	25	100 %	100 ->1:1000	2,6 (1:1000)
	anti-CYPV IIFT	positiv	25	100 %	100 ->1:1000	2,4 (1:320)
	anti-TOSV ELISA	positiv	1	4 %	1,3	
		equiv.	0			
	anti-TOSV Blot [#]	positiv	2	15,4 %	1 - 2	

Tabelle 3.4-1: Ergebnisse der IgG-Austestung der unterschiedlichen SFV-Panels mit dem anti-SFV Mosaik IIFT und dem anti-Toscana ELISA. * Die Reaktion gegen nicht aufgeführte Substrate des Mosaiks war negativ; ⁺ in 1:100 Verdünnung; [#] 13 von 25 Seren im anti-TOSV Blot getestet.

In Panels C, S und SC reagierten jeweils einzelne Seren mit dem anti-TOSV IgG-ELISA positiv bzw. grenzwertig. Eine etwas stärkere Kreuzreaktivität zeigte sich bei den Panels S und SC mit dem anti-TOSV Blot. Jeweils etwa 15 % der Seren wurden als positiv detektiert. Eine sehr starke Kreuzreaktivität war im Panel N zu sehen. Insgesamt 81,8 % der anti-SFNV-positiven Seren reagierten ebenfalls im Blot positiv.

Eine IgM-Testung wurde zusätzlich mit dem anti-TOSV ELISA und dem anti-SFV IIFT durchgeführt. Mit dem anti-TOSV IgM-ELISA konnte bei keinem Serum ein anti-TOSV IgM-Titer nachgewiesen werden. Neun der Seren reagierten jedoch positiv mit dem anti-SFV IgM-IIFT.

3.4.2 Sequenzierung und phylogenetische Untersuchung der Sandfliegen-Fieber-Viren-Stämme

Genauere Informationen über die verwendeten SFV-Stämme waren nicht bekannt; daher wurden die Sequenzen der Ns-Proteine der vier verwendeten SFV-Stämme sequenziert und phylogenetisch untersucht (950 bp). Dazu wurden die SFV-Sequenzen in den von Xu *et al.*, 2007 [201] publizierten, phylogenetischen Baum eingeordnet (siehe Abbildung 3.4-2).

Die untersuchten SFV-Stämme konnten in die bestehenden Phlebovirus-Serokomplex-Gruppen eingruppiert werden.

Die SFSV- und CYPV-Stämme des RKIs gruppieren sich in den Sicilian-Serokomplex ein, wobei der RKI SFSV-Stamm dem italienischen SFSV Sabin Stamm von 1943 und der RKI CYPV-Stamm dem CYPV-Stamm aus Zypern von 2002 am stärksten ähnelte.

Die SFNV- und TOSV-Stämme des RKIs gruppieren sich in den Naples-Serokomplex ein. Der RKI SFNV-Stamm zeigt die größte Ähnlichkeit zum Sabin Stamm von 1944 und der RKI TOSV-Stamm ähnelte am stärksten dem TOSV-Stamm aus Italien von 1971.

Der anti-SFV Mosaik IIFT umfasst demnach beide europäischen Serokomplexe und die Stämme, die im Mittelmeerraum am stärksten verbreitet sind.

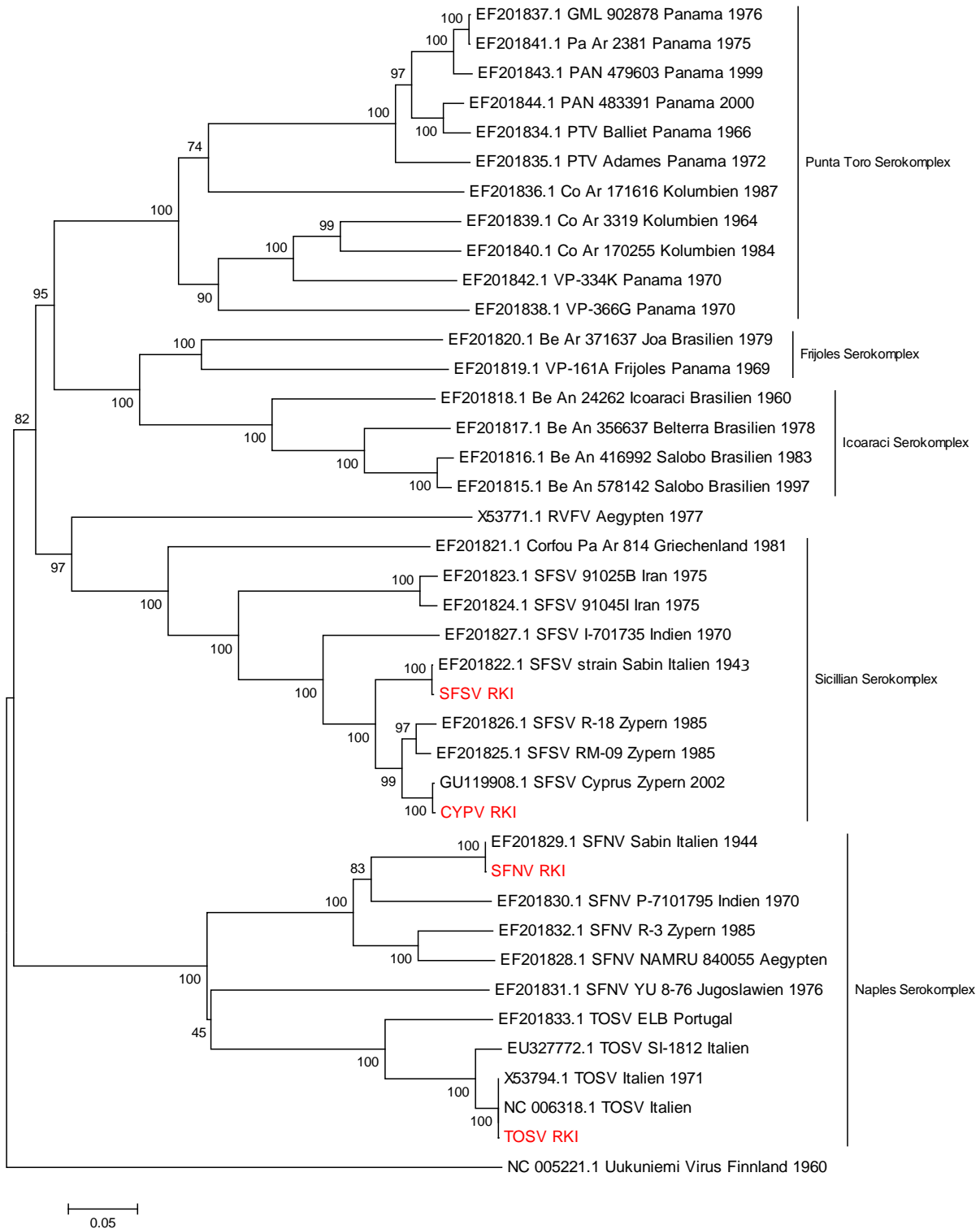


Abbildung 3.4-2: Phylogenetischer Baum verschiedener Phlebovirus-Stämme, hergestellt mit der *Neighbor joining*-Methode auf der Grundlage der Ns-Protein Nukleotidsequenzen. Die dargestellten *Bootstrap*-Werte beruhen auf einer 1000fachen Wiederholung. Die Länge der horizontalen Äste ist ein Maß für die Nukleotidsubstitutionen pro Sequenzstelle (siehe Legende am linken unteren Rand). Die Zugehörigkeit zu den Serokomplexen wurde rechts neben dem phylogenetischen Baum dargestellt.

3.5 anti-Rifttalieber-Virus IIFT

3.5.1 Evaluierung des anti-Rifttalieber-Virus IIFTs

Der anti-RVFV IIFT (siehe Abbildung 3.5-1) ist der erste kommerzielle Test zur Diagnose von humanen Testen auf anti-RVFV Antikörper. Er sollte mit Seren von RVFV-Infizierten evaluiert werden. Für die Evaluierung wurden 39 Seren saudi-arabischer RVF-Patienten (siehe Kap. 2.1.8.5) mit dem anti-RVFV IIFT und in Südafrika mit einem anti-RVFV *in-house* ELISA getestet. Der ELISA ist im National Institute for Communicable Diseases in Sandringham, Südafrika entwickelt worden und wird dort routinemäßig eingesetzt (siehe Kap. 2.2.2.6.2).

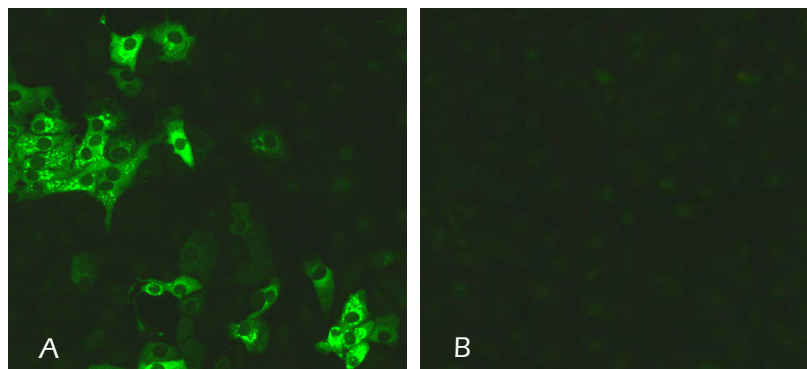


Abbildung 3.5-1: Beispiel eines BIOCHIPs mit RVFV-infizierten Zellen, inkubiert mit einem Serum einer RVFV-infizierten (A) und einer nicht infizierten Person (B). Serumverdünnung 1:100.

Vier Seren wurden im IgM-ELISA als positiv und 35 Seren als negativ diagnostiziert. Im IgG-ELISA waren 30 Seren positiv und neun Seren negativ (siehe Tabelle 3.5-1).

Serum-panels	IgM-positiv im ELISA/getestete Seren [PP]	IgM-positiv im IIFT/getestete Seren [Titerbereich]	IgG-positiv im ELISA/getestete Seren [PP]	IgG-positiv im IIFT/getestete Seren [Titerbereich]
Panel 1	4/39 (10,3 %) [7,5 -12,1]	9/39 (23,1 %) [10 - 320]	30/39 (76,9 %) [26,9 -155,5]	28/39 (71,8 %) [10 - > 1000]
Panel 2	nd	1/180 (0,6 %) [10]	nd	1/200 (0,5 %) [32]

Tabelle 3.5-1: Reaktivität der anti-RVFV IgM- and IgG-Antikörper im ELISA und IIFT. nd: nicht durchgeführt, PP: Prozentsatz der Positivität.

Von den 39 getesteten Seren wurden mit dem IgM-IIFT insgesamt neun Seren als positiv diagnostiziert. Von diesen IgM-positiven Seren waren sieben Seren im ELISA negativ. Zwei Seren, die im IgM-IIFT negativ waren, zeigten jedoch eine positive Reaktion im ELISA (siehe Tabelle 3.5-1).

Mit dem IgG-IIFT, wie auch im IgG-ELISA, wurden neun Seren, als anti-RVFV IgG-negativ getestet. Zwei der 30 IgG-ELISA-positiven Seren wurden im IgG-IIFT als negativ detektiert (siehe Tabelle 3.5-1).

Für Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiven Vorhersagewertes des IIFTs wurden die im ELISA anti-RVFV-positiv getesteten Seren und als Negativkontrolle ein Panel von norddeutschen Blutspendern verwendet (siehe Kap. 2.1.8.5). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5-1 dargestellt.

		IgM		IgG	
		Panel 1 - 2 n = 219 Vorcharakterisierung		Panel 1 - 2 n = 239 Vorcharakterisierung	
		positiv	negativ	positiv	negativ
anti-RVFV-IIFT	positiv	2	1	28	1
	negativ	2	179	2	199
Sensitivität		50 %		93,3 %	
(95 % CI)		(15 % - 85 %)		(78,7 % - 98,2 %)	
Spezifität		99,4 %		99,5 %	
(95 % CI)		(96,9 % - 99,9 %)		(97,2 % - 99,9 %)	
positiver Vorhersagewert		66,7 %		96,6 %	
(95 % CI)		(20,8 % - 93,9 %)		(82,8 % - 99,4 %)	
negativer Vorhersagewert		98,9 %		99 %	
(95 % CI)		(96,1 % - 99,7 %)		(96,5 % - 99,7 %)	

Tabelle 3.5-2: Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiven Vorhersagewertes für den anti-RVFV IgG-IIFT. 95 % CI: 95 % Konfidenzintervall.

Insgesamt ergab sich für ein RVFV-IIFT eine Sensitivität für IgM von 50 % und für IgG von 93,3 %. Die Spezifität lag bei 96,3 bzw. 99,5 % (siehe Tabelle 3.5-2).

3.5.2 Sequenzierung und phylogenetische Untersuchung des Riftalfieber-Virus-Stammes

Der für die Herstellung des anti-RVFV IIFTs verwendete RVFV-Stamm war bis dato nicht näher charakterisiert worden und sollte phylogenetisch untersucht werden. Dazu wurden die Nukleotidsequenzen des S-Segments sequenziert (1693 bp) und die Sequenz in den von Bird *et al.*, 2007 [202] publizierten, phylogenetischen Baum eingeordnet (siehe Abbildung 3.5-2).

In der Publikation von Bird *et al.* [202] wurden die untersuchten RVFV-Stämme in sieben verschiedene, genetische Linien sortiert. Der RVFV-Stamm des RKIs gruppierte sich in die

genetische Linie A und ähnelte am stärksten dem ägyptischen Stamm ZH501EGY77 von 1977.

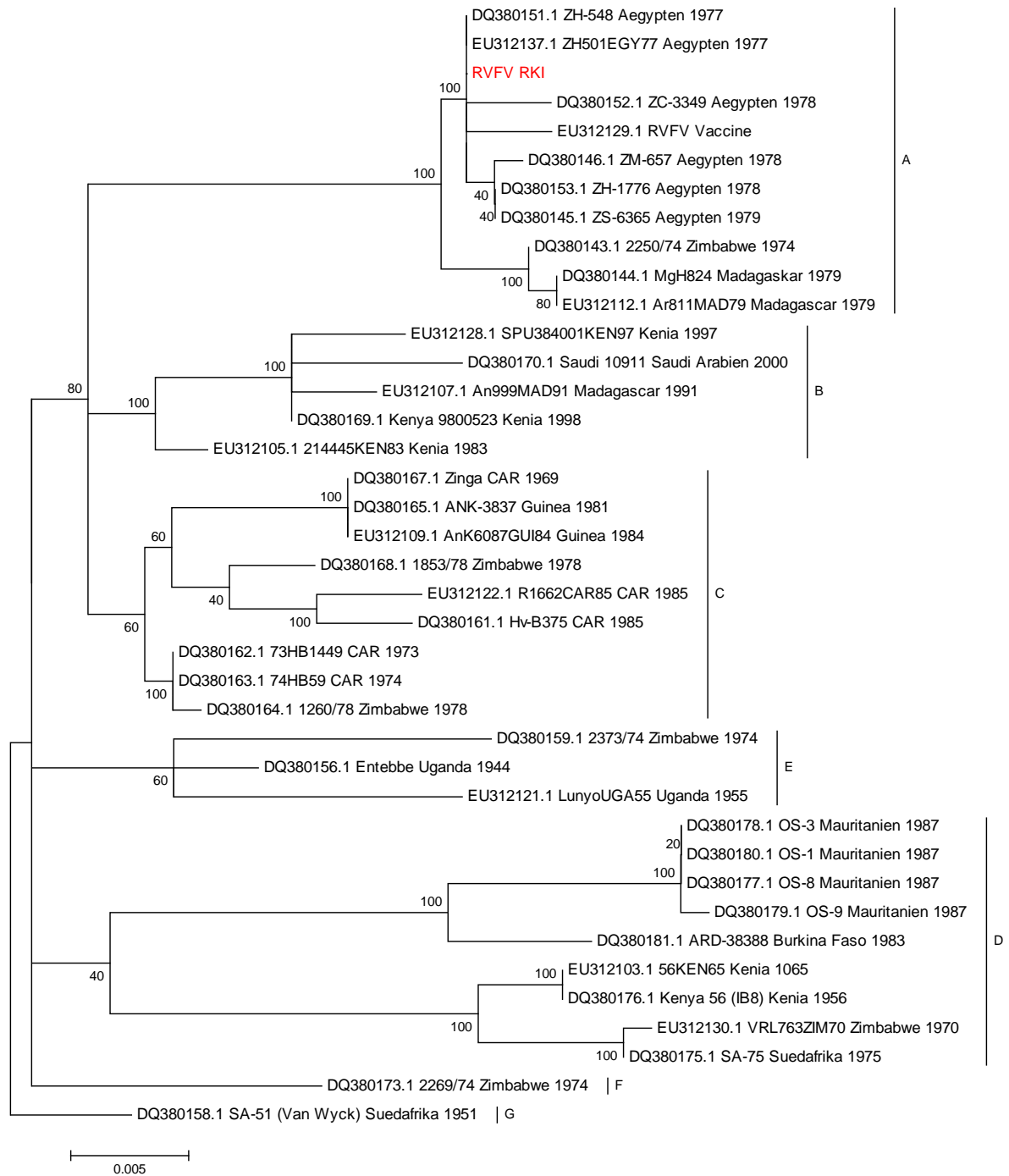


Abbildung 3.5-2: Phylogenetischer Baum der RVFV-Stämme, hergestellt mit der *Maximum-likelihood*-Methode auf der Grundlage der S-Segment-Nukleotidsequenzen. Die dargestellten *Bootstrap*-Werte beruhen auf einer 500fachen Wiederholung. Die Länge der horizontalen Äste ist ein Maß für die Nukleotidsubstitutionen pro Sequenzstelle (siehe Legende am linken unteren Rand). Die Zugehörigkeit zu den verschiedenen Linien (A - G) wurde rechts neben dem phylogenetischen Baum dargestellt.

3.6 Herstellung und Evaluierung rekombinanter, serologischer Teste

3.6.1 anti-Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus Mosaik IIFT

3.6.1.1 Transfektionsprotokoll zur Herstellung des rekombinanten anti-Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus IFTs

Da es für den weit verbreiteten BSL-4-Erreger CCHFV an kommerziellen, serologischen Testen mangelt, sollte ein rekombinanter IIFT zur Detektion von anti-CCHFV-Antikörpern entwickelt werden. Dazu wurden das N-Protein und der Glykoproteinvorläufer GPC, der in die Glykoproteine G_N/G_C gespalten wird, ausgewählt. Für das N-Protein und die Glykoprotein wurde in der Literatur eine spezifische Antikörperantwort beschrieben [118,121]. Die verwendeten Plasmide wurden von Ramon Flick bereitgestellt.

Zur Optimierung des Transfektionsprotokolls für diese CCHFV-Plasmide wurden verschiedene Zelllinien ausgetestet. Die HEK 293^{RKI}-Zellen zeigten mit 30 - 50 % die beste Transfektionseffizienz mit den CCHFV-Substraten und wurden für die weiteren Versuche verwendet (siehe Tabelle 3.6-1).

Zelllinie	Transfektionseffizienz	
	GPC-Plasmid	N-Plasmid
Vero E6	1 - 2 %	1 - 2 %
BHK21	1 - 2 %	1 - 2 %
CHO	10 - 30 %	20 - 30 %
Hela	1 - 20 %	1 - 20 %
HEK 293 Graham	1 - 10 %	1 - 10 %
HEK 293 ^{RKI}	30 - 50 %	30 - 50 %

Tabelle 3.6-1: Transfektionseffizienz der CCHFV-Plasmide in verschiedenen Zelllinien. Ermittelt wurde die Prozentzahl der transfizierten Zellen pro Gesichtsfeld nach Inkubation mit einem anti-CCHFV IgG-positiven Serum.

Das Protokoll wurde weiterhin bezüglich der verwendeten DNA-Konzentration und der Transfektionsdauer optimiert.

In Abbildung 3.6-1 erkennt man HEK 293^{RKI}-Zellen, die das G_N/G_C und das N-Protein exprimieren. Es zeigte sich für beide Proteine eine typische Fluoreszenz nach Inkubation mit anti-CCHFV-positiven Seren. Während die G_N/G_C -Proteine eher eine fein über die Zelle verteilte Fluoreszenz bildete, waren beim N-Protein wesentlich mehr Protein-Aggregate zu erkennen.

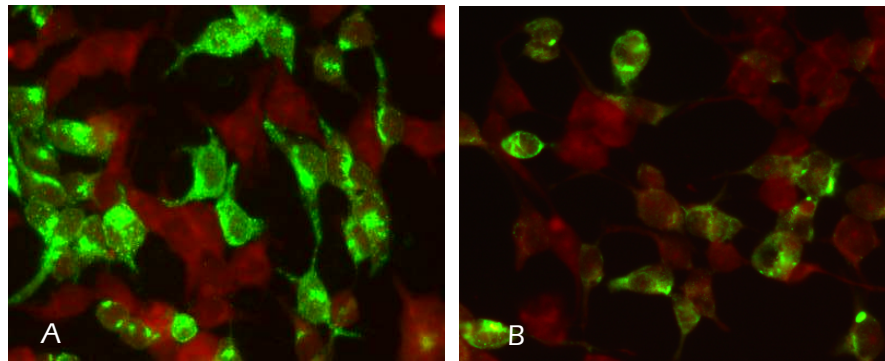


Abbildung 3.6-1: Beispiel je eines BIOCHIPs mit HEK 293^{RKI}-Zellen, die die CCHFV-G_N/G_C-Proteine (A) und das CCHFV-N-Protein (B) exprimieren, inkubiert mit einem Serum einer CCHFV-infizierten Person. Die rote Färbung beruht auf dem Einsatz von Evan's Blue im Sekundär-Antikörper zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz; Serumverdünnung 1:100.

3.6.1.2 Evaluierung des anti-Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus

Mosaik IIFTs

Der entwickelte, rekombinante anti-CCHFV Mosaik IIFT sollte mit insgesamt fünf Serumpaneln aus verschiedenen geographischen Gebieten (siehe Kap. 2.1.8.6) evaluiert werden. Insgesamt handelte es sich um 200 Seren für die IgM-Bestimmung und 168 Seren für die IgG-Bestimmung.

Das CCHFV-Panel 1 bestand aus 70 IgM-positiv und 34 IgM-negativ, sowie 54 IgG-positiv und 39 IgG-negativ vorcharakterisierten Seren von CCHFV-Patienten aus dem Kosovo. Das CCHFV-Kollektiv 2 waren 18 IgM-positiv und 52 IgG-positiv Seren aus dem Iran und CCHFV-Panel 3 waren 60 IgM-positiv und 5 IgG-positiv Seren von CCHFV-infizierten Patienten aus der Türkei. Das CCHFV-Panel 4 bestand aus 14 IgM-positiv und 4 IgM-negativen, sowie 13 IgG-positiv und 5 IgG-negativen Seren von CCHFV-Infizierten aus Südafrika. Die vier verschiedenen Panles wurden mit den entsprechenden *in-house* ELISAs Nr. 1 - Nr. 4 getestet (siehe Kap. 2.2.2.7.2). Als Negativkontrolle dienten 45 deutsche Blutspender (CCHFV-Panel 5).

Alle CCHFV-Panels wurden mit dem IgM- bzw. IgG-IIFT auf CCHFV-Antikörper untersucht und die Ergebnisse mit den Ergebnissen des jeweiligen *in-house* ELISAs verglichen (siehe Tabelle 3.6-2).

CCHFV-Panel 5

Das CCHFV-Panel 5, deutsche Blutspender ohne Risiko einer CCHFV-Infektion, wurde mit dem IgM-IIFT und dem IgM-ELISA Nr. 1 untersucht. Alle 45 Seren waren im IgM-ELISA negativ. Im IgM-IIFT reagierte ein Serum schwach positiv, mit einem Titer von 1:10. Alle 45 Seren wurden im IgG-IIFT und IgG-ELISA Nr. 1 als negativ detektiert.

Insgesamt konnte eine Spezifität von 97,8 % für den IgM-IIFT und 100 % für den IgG-IIFT ermittelt werden.

CCHFV-Panel 1

Im CCHFV-Panel 1 konnten 54,3 % der im ELISA IgM-positiven Seren mit dem IgM-IIFT als positiv detektiert werden. Wurden die Seren sowohl im IgM- als auch im IgG-IIFT untersucht, war es möglich 77,1 % der Seren als positiv zu diagnostizieren.

83,3 % der im IgG-ELISA positiven Seren konnten mit dem IgG-IIFT positiv diagnostiziert werden. Keine weiteren IgG-positiven Seren konnten mit dem IgM-IIFT detektiert werden.

Insgesamt ergaben sich im Vergleich zum ELISA Nr. 1 für den IgM-IIFT eine Sensitivität von 54,3 % und ein positiver Vorhersagewert von 97,4 %. Für den IgG-IIFT lag die Sensitivität bei 83,3 % und der positive Vorhersagewert bei 100 %.

Es wurden außerdem 17 PCR-positive, jedoch IgM- und IgG-ELISA-negative Seren mit dem IgM-IIFT untersucht. Davon wurden drei Seren (18 %) als positiv detektiert.

CCHFV-Panel 2

Von den 18 IgM-positiven Seren des CCHFV-Panels 2 waren acht Seren auch im IgM-IIFT positiv, d.h. der IgM-IIFT zeigte eine Sensitivität von 44,4 %. Mit dem IgG-IIFT konnten jedoch alle 52 IgG-positiven Seren als positiv detektiert werden, was einer Sensitivität von 100 % entspricht. Der positive Vorhersagewert für den IgM- und IgG-IIFT lag bei 88,9 % bzw. 100 %.

CCHFV-Panel 3

Das CCHFV-Panel 3 bestand aus 60 IgM-positiven Seren, die im ELISA Nr. 3 charakterisiert wurden. 56 dieser Seren wurden mit dem IgM-IIFT als positiv diagnostiziert. Demnach ergaben sich eine Sensitivität von 93,3 % und ein positiver Vorhersagewert von 98,3 %.

Der IgG-IIFT zeigte mit den fünf Seren des CCHFV-Panels 3 eine Sensitivität und einen positiven Vorhersagewert von 100 %.

CCHFV-Panel 4

14 der 18 Seren des CCHFV-Panels 4 waren im ELISA Nr. 4 IgM-positiv. 13 der Seren konnten im IgM-IIFT als positiv detektiert werden. Insgesamt wurde für den IgM-IIFT eine Sensitivität und ein positiver Vorhersagewert von 92,9 % ermittelt.

Mit dem IgG-IIFT konnten 8 von 13 Seren als IgG-positiv getestet werden, was einer Sensitivität von 61,5 % entspricht. Der positive Vorhersagewert lag bei 100 %.

Ein Serum eines CCHFV-Infizierten aus dem CCHFV-Panel 4, das im IgM- und IgG-ELISA als negativ getestet worden war, konnte sowohl mit dem IgM-IIFT als auch mit dem IgG-IIFT als positiv diagnostiziert werden. Sowohl mit dem ELISA als auch mit dem IIFT konnten also in insgesamt 14 der 18 Seren von CCHFV-Infizierten CCHFV-Antikörper nachgewiesen werden.

Serum-panels	IgM-positiv im ELISA/getestete Seren [OD]	IgM-positiv im EUROIMMUN IIFT/getestete Seren [Titerbereich]	IgG-positiv im ELISA/getestete Seren [OD]	IgG-positiv im EUROIMMUN IIFT/getestete Seren [Titerbereich]
Panel 1	70/104 (67,3 %) [0 - > 6400]	42/104 (40,4 %) [0 - > 1000]	54/93 (58,1 %) [0 - > 6400]	47/93 (50,5 %) [0 - > 1000]
Panel 2	18/18 (100 %) [0,480 - 1,645]	8/18 (44,4 %) [0 - 32]	52/52 (100 %) [0,247 - 1,630]	52/52 (100 %) [100 - 10.000]
Panel 3	60/60 (100 %) [1,168 - 5,165]	56/60 (93,3 %) [0 - 1000]	5/5 (100 %) [6,400]	5/5 (100 %) [100 - > 1000]
Panel 4	14/18 (77,8 %) [0 - 143]	13/18 (72,2 %) [0 - 1000]	13/18 (72,2 %) [0 - 97,5]	9/18 (50 %) [0 - 320]
Panel 5	0/45 (0 %)	1/45 (2,2 %) [0 - 10]	0/45 (0 %)	0/45 (0 %)

Tabelle 3.6-2: Reaktivität der Seren im anti-CCHFV IgM- und IgG-ELISA/IIFT.

Ein Überblick über die berechneten Sensitivitäten und positiven Vorhersagewerte für die verschiedenen Panels sind in der Tabelle 3.6-3 und Tabelle 3.6-4 dargestellt.

Durch die starken Unterschiede der Sensitivitäten mit den einzelnen Panels und ELISAs ist eine Berechnung einer Gesamt-IgM-Sensitivität nicht sinnvoll. Für den IgG-IIFT ergab sich eine Gesamt-Sensitivität von 88,7 %.

Vorcharakterisierung (IgM)

	ELISA Nr. 1 - Panel 5		ELISA Nr. 1 - Panel 1		ELISA Nr. 2 - Panel 2		ELISA Nr. 3 - Panel 3		ELISA Nr. 4 - Panel 4	
	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.
anti-CCHFV IIFT (IgM)	1	38	1	38	8	56	13			
	pos.		pos.							
	neg.		neg.							
Sensitivität	54,3 %		44,4 %		93,3 %		92,9 %			
(95 % CI)	(42,7 % - 65,4 %)		(24,6 % - 66,3 %)		(84,1 % - 97,4 %)		(68,5 % - 98,7 %)			
Spezifität	97,8 %									
(95 % CI)	(88,7 % - 99,6 %)									
pos. Vorhersagewert	97,4 %		88,9 %		98,3 %		92,9 %			
(95 % CI)	(86,8 % - 99,6 %)		(56,5 % - 98 %)		(90,7 % - 99,7 %)		(68,5 % - 98,7 %)			
neg. Vorhersagewert	58,4 %		81,8 %		91,8 %		97,8 %			
(95 % CI)	(47,3 % - 68,8 %)		(69,7 % - 89,8 %)		(80,8 % - 96,8 %)		(88,7 % - 99,6 %)			

Tabelle 3.6-3: Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiven und negativen Vorhersagewertes für den anti-CCHFV IgM-IIFT. 95 % CI: 95 % Konfidenzintervall.

ERGEBNISSE

		Vorcharakterisierung (IgG)				
		ELISA Nr. 1 - Panel 5	ELISA Nr. 1 - Panel 1	ELISA Nr. 2 - Panel 2	ELISA Nr. 3 - Panel 3	ELISA Nr. 4 - Panel 4
		neg.	pos.	pos.	pos.	pos.
anti-CCHFV IIFT (IgG)	pos.	0	45	52	5	9
	neg.	45	9	0	0	4
Sensitivität			83,3 %	100 %	100 %	69,2 %
(95 % CI)			(71,3 % - 91 %)	(93,1 % - 100 %)	(56,6 % - 100 %)	(42,4 % - 87,3 %)
Spezifität	100 %					
(95 % CI)	(92,1 % - 100 %)					
pos. Vorhersagewert			100 %	100 %	100 %	100 %
(95 % CI)			(92,1 % - 100 %)	(93,1 % - 100 %)	(56,6 % - 100 %)	(70,1 % - 100 %)
neg. Vorhersagewert			83,3 %	100 %	100 %	91,8 %
(95 % CI)			(71,3 % - 91 %)	(92,1 % - 100 %)	(92,1 % - 100 %)	(80,8 % - 96,8 %)

Tabelle 3.6-4: Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiven und negativen Vorhersagewertes für den anti-CCHFV IGM-IIFT. 95 % CI: 95 % Konfidenzintervall.

Bei 47 der Seren des CCHFV-Panel 1 war bekannt an welchem Tag nach Symptombeginn die Blutentnahme stattfand. In Tabelle 3.6-5 ist dargestellt zu welchem Zeitpunkt wie viel Prozent der Seren vom IIFT und vom ELISA als positiv diagnostiziert wurden.

	Erkrankungstag bei Blutentnahme			
	Tag 1 - 10	Tag 11 - 20	Tag 21 - 30	Tag 31 - 60
Anzahl Seren getestet im IIFT	12	16	9	10
IgM-IIFT-positiv	42 %	81 %	44 %	50 %
IgG-IIFT-positiv	33 %	81 %	100 %	100 %
IgM- oder IgG-IIFT-positiv	50 %	88 %	100 %	100 %
Anzahl Seren getestet im IgM-ELISA / Anzahl Seren getestet im IgG-ELISA	12/12	16/15	9/5	10/8
IgM-ELISA	92 %	100 %	100 %	100 %
IgG-ELISA	42 %	87 %	100 %	100 %
IgM-oder IgG-ELISA	100 %	100 %	100 %	100 %

Tabelle 3.6-5: Anteil der positiv getesteten Seren geordnet nach dem Erkrankungstag zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

Es zeigt sich, dass sowohl der IgG-IIFT wie auch der IgG-ELISA erst zwischen Tag 21 - 30 mit allen Seren positiv reagierten. In den Seren von Tag 1 - 10 wurden nur 33 bzw. 42 % mit dem IIFT bzw. ELISA als positiv detektiert, und zwischen Tag 11 - 20 dann 81 bzw. 87 %. Dabei zeigte der IgG-ELISA jeweils eine etwas höhere Sensitivität im Vergleich zum IgG-IIFT.

Der IgM-IIFT detektierte fast über den gesamte Zeitraum (mit Ausnahme von Tag 11 - 20) nur einen Anteil von 40 - 50 % der Seren als positiv. Mit dem IgM-ELISA hingegen wurden, mit Ausnahme der ganz früh entnommenen Seren, alle Seren der CCHFV-Erkrankten als positiv erkannt. Wenn die IgM- und IgG-Ergebnisse der jeweiligen Seren gemeinsam betrachtet werden, ergibt sich, dass jeweils insgesamt mehr Seren als positiv erkannt werden. Mit den ELISAs ist es auf diese Weise möglich alle Seren zu allen Zeiten als positiv zu diagnostizieren.

Von 16 Seren des CCHFV-Panels 1, entnommen nach abgeklungener Infektion, waren zehn Seren IgG-IIFT-positiv (davon ein Serum ebenfalls IgM-IIFT-positiv). Alle Seren waren im IgG-ELISA-positiv und im IgM-ELISA-negativ getestet worden.

Zusätzlich wurde die Reaktivität der beiden rekombinanten Proteine untersucht (siehe Tabelle 3.6-6 und Abbildung 3.6-2).

IgM-IIFT					
	Panel Nr. 1	Panel Nr. 2	Panel Nr. 3	Panel Nr. 4	insgesamt
Gesamtanzahl der IIFT-reaktiven Seren	39	8	56	16	119
reaktiv mit nur einem Antigen	25 (64,1 %)	8 (100 %)	45 (80,4 %)	13 (81,3 %)	91 (76,5 %)
G_N/G_C-reaktive Seren	25 (64,1 %)	0	11 (19,6 %)	4 (25 %)	40 (33,6 %)
ausschließlich G _N /G _C -reaktiv	8 (20,5 %)	0	1 (1,8 %)	1 (6,3 %)	10 (8,4 %)
N-reaktive Seren	34 (87,2 %)	8 (100 %)	55 (98,2 %)	15 (93,8 %)	112 (94,1 %)
ausschließlich N-reaktiv	17 (43,6 %)	8 (100 %)	44 (78,6 %)	12 (75 %)	81 (68,1 %)

IgG-IIFT					
	Panel Nr. 1	Panel Nr. 2	Panel Nr. 3	Panel Nr. 4	insgesamt
Gesamtanzahl der IIFT-reaktiven Seren	58	52	5	14	129
reaktiv mit nur einem Antigen	11 (19 %)	0	0	2 (14,3 %)	12 (9,3 %)
G_N/G_C-reaktive Seren	58 (100 %)	52 (100 %)	5 (100 %)	13 (92,9 %)	128 (99,2 %)
ausschließlich G _N /G _C -reaktiv	11 (19 %)	0	0	1 (7,2 %)	11 (8,5 %)
N-reaktive Seren	47 (81 %)	52 (100 %)	5 (100 %)	13 (92,9 %)	117 (90,7 %)
ausschließlich N-reaktiv	0	0	0	1 (7,2 %)	1 (0,8 %)

Tabelle 3.6-6: Berechnung der Reaktivitäten der einzelnen rekombinanten CCHFV-Proteine in den einzelnen CCHFV-Panels.

Es zeigte sich, dass in der Regel das N-Protein deutlich besser durch IgM-Antikörper erkannt wurde, während das rekombinante G_N/G_C-Substrat geringfügig besser mit den IgG-Antikörpern detektiert werden konnte. Zum Teil wurden jedoch starke Unterschiede in den Reaktivitäten mit den vier verschiedenen Panels gefunden.

Bei ausschließlicher Verwendung des N-Proteins wären insgesamt 8,4 bzw. 8,5 % der Seren im IgM-IIFT und IgG-IIFT nicht mehr erkannt worden.

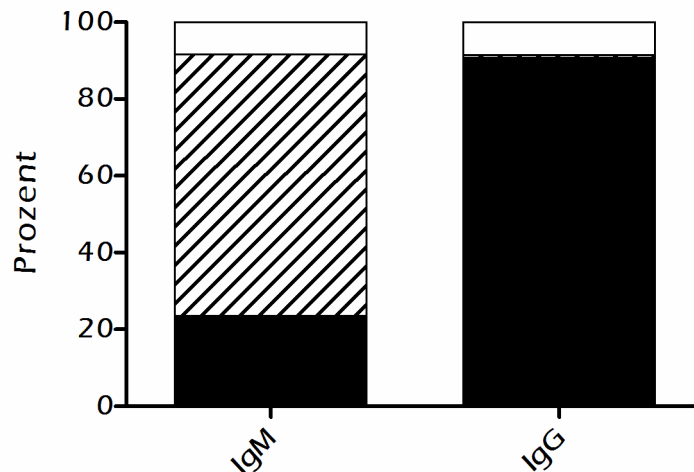


Abbildung 3.6-2: Darstellung der Reaktivität der rekombinanten Proteine. Ausgefüllter Balken: Anteil der Seren, die mit dem N- und G_N/G_C-Protein positiv reagiert haben; gestreifte Balken: Anteil der Seren, die ausschließlich mit dem N-Protein positiv reagiert haben; weißer Balken: Anteil der Seren, die ausschließlich mit dem G_N/G_C-Protein positiv reagiert haben.

3.6.1.3 Austestung von weiteren Substraten zur Detektion von Antikörpern gegen das Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus

Ein Bedarf an einem kommerziellen ELISA zur Untersuchung größerer Probenmengen auf CCHFV-Antikörper ist in einigen endemischen Gebieten, wie beispielsweise der Türkei, vorhanden. Es sollten daher weitere anti-CCHFV-Substrate zunächst im IIFT auf ihre antigene Eignung ausgetestet werden, um sie in Zukunft als ELISA-Substrate einzusetzen. Die Plasmide wurden so konstruiert, dass die Proteine für den ELISA im Baculovirussystem hergestellt werden können. Der Vektor pTriEx-1 mit kodierenden Sequenzen für das CCHFV N-Protein, G_N- und G_C-Protein wurde dazu in HEK 293^{RKI}-Zellen transfiziert und exprimiert. Die Substrate wurden im IIFT mit einer Auswahl von 25 türkischen Seren inkubiert, um ihre Reaktivität zu testen und sie im Vergleich zu den ursprünglichen IIFT-Substraten zu beurteilen (siehe Abbildung 3.6-3).

In Tabelle 3.6-7 sieht man, dass insgesamt das N-Protein im pTriEx-1 (verändertes N-Substrat) in beiden rekombinanten IIFTs eine stärkere Reaktivität zeigte als das ursprüngliche N-Substrat. Im IgM-IIFT wurde das herkömmliche G_N/G_C-Protein besser von den Seren erkannt als die einzelnen G_N- und G_C-Proteine. Im IgG-IIFT lag die Reaktivität des G_C-Proteins jedoch über der vom G_N/G_C-Protein. Insgesamt wurde das G_C-Protein besser erkannt als das G_N-Protein.

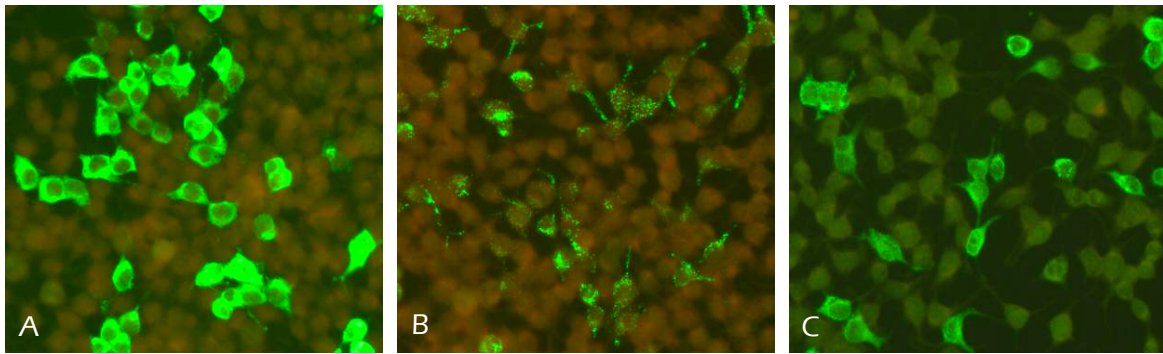


Abbildung 3.6-3: Beispiel von BIOCHIPs bewachsen mit HEK 293^{RKI}-Zellen, die das CCHFV-N-Protein (A), CCHFV-G_N- (B) und CCHFV-G_C-Protein (C) exprimieren, inkubiert mit einem Serum einer CCHFV-infizierten Person. Die rote Färbung beruht auf dem Einsatz von Evan's Blue im Probenverdünnungspuffer zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz; Serumverdünnung 1:100.

	Substrat	N [Titer- bereich]	G _N /G _C [Titer- bereich]	G _C [Titer- bereich]	G _N [Titer- bereich]	Insgesamt [Titer-bereich]
IgM						
n = 25	I	11 (44 %) [10 - 1000]	6 (24 %) [10 - 1000]	nd	nd	12 (48 %) [10 - 1000]
	II	20 (80 %) [100 - > 1000]	nd	4 (16 %) [10 - 100]	1 (4 %) [100]	20 (80 %) [10 - > 1000]
IgG						
n = 25	I	14 (56 %) [32 - > 1000]	16 (64 %) [100 - > 1000]	nd	nd	18 (72 %) [32 - > 1000]
	II	18 (72 %) [100 - > 1000]	nd	19 (76 %) [10 - > 1000]	3 (12 %) [10 - 100]	20 (80 %) [10 - > 1000]

Tabelle 3.6-7: Ergebnisse der IIFT-Austestung mit den verschiedenen CCHFV-Substraten mit einer Auswahl von Seren von CCHFV-Infizierten aus der Türkei. Substrat I: ursprüngliches IIFT-Substrat; Substrat II: verändertes IIFT-Substrat; nd: nicht durchgeführt.

Zusammengenommen konnten mit den neuen Substraten mehr Seren als positiv detektiert werden als mit den herkömmlichen IIFT-Substraten. Diese Proteine sollen in Zukunft im Baculovirussystem hergestellt, aufgereinigt und in einem ELISA eingesetzt werden.

3.6.2 anti-Dengue-Virus NS1 Mosaik IIFT

3.6.2.1 Herstellung und Evaluierung eines rekombinanten anti-Dengue-Virus Testes

Mit dem konventionell hergestellten anti-DENV Mosaik IIFT konnten ca. 50 % der Seren richtig serotypisiert werden. Es sollte aufbauend auf diesen Ergebnissen eine rekombinante Strategie entwickelt werden, um die Rate der richtig serotypisierten Seren weiter zu erhöhen.

Dazu wurden von allen vier DENV-Serotypen NS1-Proteine in den Expressionsvektor pTriEx-3 kloniert. Diese DENV NS1-Proteine sollten als Substrat in der Immunfluoreszenz eingesetzt werden. Zunächst wurde mittels einer One Step RT-PCR die RNA der NS1-Proteine aller Dengue-Serotypen amplifiziert und die entsprechenden 1056 bp-DNA-Fragmente in den pTriEx-3-Vektor kloniert. Der Vektor hat u.a. eine C-terminale Sequenz, die für einen His-Tag kodiert, so dass die entstehenden Proteine mit diesem markiert waren.

HEK 293^{RKI}-Zellen wurden mit diesen DENV-Konstrukten transfiziert und auf Deckgläsern kultiviert. Von den Deckgläsern wurden, nach Aceton-Fixierung, Probe-IIFTs hergestellt, die mit einem monoklonalen anti-His- und einem anti-DENV NS1-Antikörper, sowie mit einem Panel von 13 anti-DENV-positiven Seren inkubiert wurden.

Der anti-His-Antikörper zeigte eine Reaktion in ca. 15 % der Zellen. Mit dem monoklonalen anti-DENV NS1-Antikörper, der laut Hersteller nur native NS1-Proteine erkennt, waren jedoch keine Proteine nachweisbar. Auch die Reaktion des DENV-Serum-Panels war sehr schwach. Nur in zwei von zehn DENV-positiven Seren (20 %) konnte eine leichte Fluoreszenz der DENV NS1-Proteine detektiert werden. Eine Bestimmung des Serotyps war nicht möglich.

Es sollte daher im Anschluss überprüft werden, ob die Proteine in der entsprechenden Größe detektierbar waren, oder posttranslational geschnitten wurden, bzw. ob sie in großen Mengen aus den Zellen ausgeschleust wurden. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Proteine im halbnativen Western Blot, der sensitiver ist als der IIFT, mit dem monoklonalen anti-DENV NS1-Antikörper erkannt werden konnten. Dazu wurden die transfizierten Zellen nach zwei Tagen mittels Ripa-Puffer lysiert und das Lysat zusammen mit dem Zellkulturüberstand im Western Blot untersucht (siehe Abbildung 3.6-4).

In den aufgetrennten Zelllysaten der DENV NS1-transfizierten Zellen war mit dem anti-His-AK eine spezifische Bande von 45 kDa zu erkennen, entsprechend der Größe des NS1-Proteins. In allen Zelllysaten zeigte sich zudem eine His-reaktive, unspezifische Bande bei ca. 65 kDa, möglicherweise ein β -Mercaptoethanol-Blot-Artefakt.

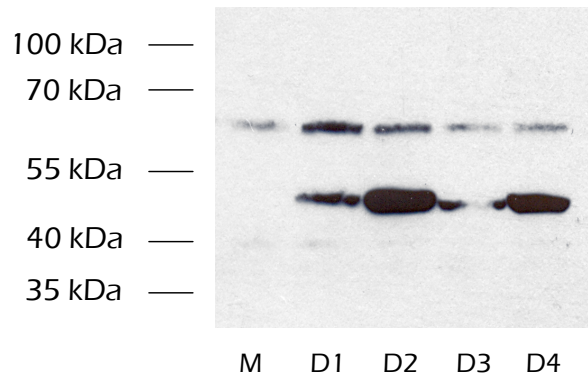


Abbildung 3.6-4: Western Blot mit pTriEx-3-DENV NS1-Konstrukten aus transfizierten, Ripa-lysierten HEK 293^{RKI}-Zellen. Nachweis mit anti-His-Antikörper (1:100) und anti-Maus-Antikörper/HRP (1:8000). M = Mock-transfiziert, D1 = DENV-1 NS1-transfiziert, D2 = DENV-2 NS1-transfiziert, D3 = DENV-3 NS1-transfiziert, D4 = DENV-4 NS1-transfiziert.

Mit dem anti-DENV NS1-Antikörper im halbnativen Blot konnte jedoch kein NS1 nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung des Zellkulturüberstands der DENV NS1-transfizierten Zellen war ebenfalls kein NS1-Protein nachweisbar.

Die NS1-Proteine wurden also in der entsprechenden Größe produziert, ließen sich aber im nativen Zustand im IIFT und Western Blot mittels des anti-DENV NS1-Antikörpers nicht nachweisen. Die mangelnde Reaktivität konnte also auf einer unvollständigen Faltung oder einer fehlenden Glykosylierung zurückzuführen sein. Daher wurden im Anschluss Konstrukte hergestellt, die zusätzlich eine DENV-Sequenz enthielten, die für ein Signalpeptid zur ER-Lokalisation kodiert. Diese Sequenz liegt im Polyprotein im 3'-Ende der E-Protein-Sequenz, also vor der für das NS1-Protein kodierenden Sequenz.

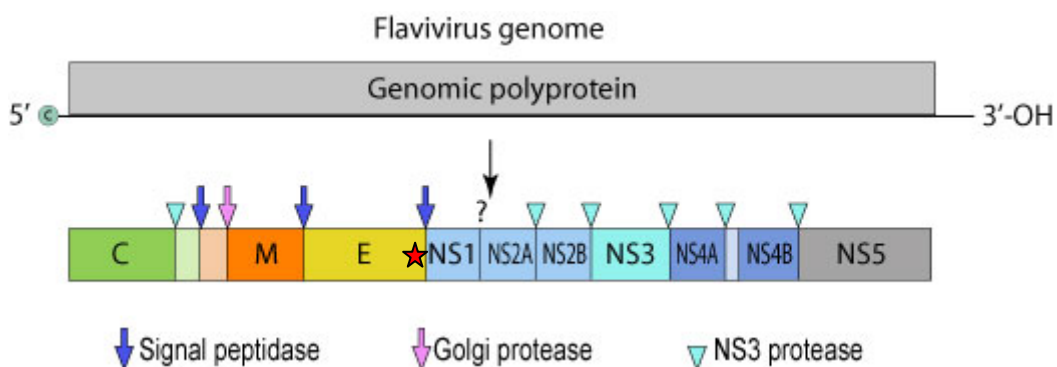


Abbildung 3.6-5: Schematische Darstellung des DENV-Polyproteins. Der rote Stern kennzeichnet die Lage der NS1-Signalsequenz.

Quelle: ViralZone, www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics.

Die entsprechenden 1150 bp-DNA-Fragmente wurden wie zuvor in den pTriEx-3-Vektor kloniert, in HEK 293^{RKI}-Zellen exprimiert und Probe-IIFTs hergestellt. Diese IIFTs wurden wiederum mit einem monoklonalen anti-His- und einem anti-DENV NS1-Antikörper, sowie mit 10 anti-DENV-positiven Seren inkubiert.

Der anti-DENV NS1-Antikörper reagierte nur stark mit dem DENV-1- und DENV-2-Substrat, der anti-His-Antikörper mit dem DENV-1-, DENV-2- und DENV-4-Substrat. Das DENV-3-

Substrat wurde von beiden Antikörpern im Vergleich nur schwach erkannt (siehe Abbildung 3.6-6).

Alle zehn DENV-positiven Patientenseren zeigten eine positive Reaktion mit zumindest einem Serotyp und auch das DENV-3-Substrat wurde von sieben Seren erkannt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden von der Firma EUROIMMUN IFTs gefertigt, die mit fünf BIOCHIPS bestückt waren. Vier BIOCHIPS enthielten jeweils Zellen, transfiziert mit einem der rekombinanten DENV NS1-Proteinen und ein BIOCHIP enthielt nicht transfizierte Zellen.

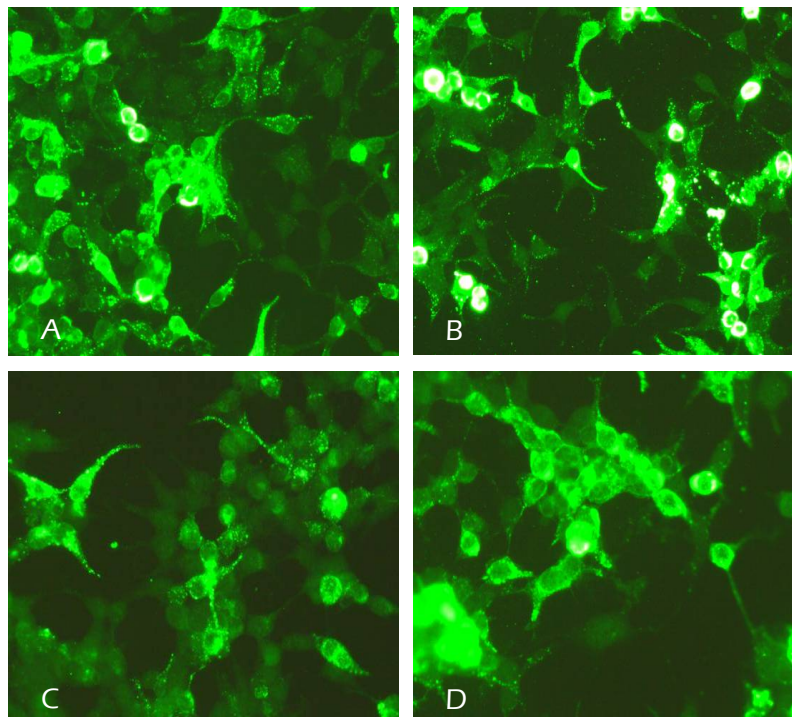


Abbildung 3.6-6: 293T-Zellen, transfiziert mit dem NS1-Protein des DENV-1 (A), DENV-2 (B), DENV-3 (C) und DENV-4 (D), inkubiert mit dem anti-His-Antikörper (1:100) und anti-Maus-Antikörper/FITC (1:200).

3.6.2.2 Evaluierung des anti-Dengue Virus NS1 Mosaik IFTs

Der rekombinanten anti-DENV NS1 Mosaik IFT wurde mit den DENV-Serum-Panels 1 und 2 (siehe 2.1.8.3) inkubiert. Die Ergebnisse dieser DENV-Serum-Panel-Inkubation sind in Tabelle 3.6-8 dargestellt.

Die DENV-Serum-Panel 1 und 2 wurden zuvor ebenfalls zur Inkubation des konventionellen anti-DENV Mosaik IFTs verwendet (siehe Kap. 3.3.1) und die Ergebnisse beider Inkubationen konnten verglichen werden. Wie schon im Rahmen der Evaluierung dieses konventionellen anti-DENV Mosaik IFTs beschrieben, besteht das Panel 1 vor allem aus Seren von Primärinfektionen und das Panel 2 hauptsächlich aus Seren von Sekundärinfektionen.

ERGEBNISSE

Herkunft	Zeitpunkt nach Beginn der Symptome [Tage]	Serotyp per PCR	NS1 IgM-IFIT			NS1 IgG-IFIT			Aviditäts-ELISA			Deutung	
			maximale Titer aller vier Serotypen	Serotyp mit dem höchsten Titer	maximale Titer aller vier Serotypen	Serotyp mit dem höchsten Titer	richtiger Serotyp insgesamt	anderer Serotyp insgesamt	ELISA [normierte OD]	ELISA (mit Harnstoff) [normierte OD]	Quotient [%]		
Pand 1													
1	Kenia	19	DEN-1	0	-	100 ->1000	1	DENV-1	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
2	Dominik. Republik	-	DEN-1	10	2	10 - 320	1	DENV-1	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
3	Indonesien	9	DEN-1	100	2	100	1/2	-	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
4	Indien	20	DEN-2	100	2	32	2	DENV-2	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
5	Indien	18	DEN-2	1000	2	100 - 1000	2	DENV-2	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
6	Sri Lanka	11	DEN-2	320	2	1000	2	DENV-2	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
7	Indien	23	DEN-2	100 - 1000	2	100 ->1000	2/4	-	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
8	Puerto Rico	48	DEN-3	10	4	100	1	DENV-1	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
9	Venezuela	20	DEN-3	10 - 32	2	10 - 100	1	DENV-1	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
10	Indien	18	DEN-3	10	2	0	-	-	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
11	Thailand	40	DEN-3	0	2	32 - 320	2	DENV-2	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
12	Nicaragua	49	DEN-4	10 - 100	4	1000	4	DENV-4	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
13	Reunion	2	DEN-1	10	2	0	-	-	0,188	0,141	nd	(74,9)	(Sekundärinfektion)
14	Reunion	-	DEN-1	0	-	0	-	-	0,218	0,162	nd	(74,4)	(Sekundärinfektion)
15	Seychellen	4	DEN-1	0	-	32 - >1000	2	DENV-2	2,588	2,157	nd	83,3	Sekundärinfektion
16	ex-Madagaskar	5	DEN-1	0	-	100 - 320	2/4	-	1,853	1,324	nd	71,5	Sekundärinfektion
17	ex-Tahiti	3	DEN-1	0	-	0	-	-	0,648	0,337	nd	(51,9)	(Sekundärinfektion)
18	ex-Mexiko	4	DEN-1	0	-	0	-	-	nd	nd	nd	-	Primärinfektion
19	ex-Dom. Rep.	6	DEN-1	10	2/4	10	1	DENV-1	0,214	0,127	nd	(59,4)	(Sekundärinfektion)
20	ex-Indonesien	9	DEN-1	32	2	32 - 1000	1	DENV-1	0,487	0,175	nd	(36,0)	(Primärinfektion)
21	Martinique	5	DEN-2	0	-	0	-	-	1,312	0,758	nd	57,7	Sekundärinfektion
22	Guadeloupe	2	DEN-2	0	-	32	1/2/4	-	0,813	0,469	nd	(57,7)	(Sekundärinfektion)
23	Guadeloupe	/	DEN-2	0	-	100	1/2/4	-	2,607	1,820	nd	69,8	Sekundärinfektion
24	Guadeloupe	5	DEN-2	0	-	32 - 320	1	DENV-1	2,910	1,978	nd	68,0	Sekundärinfektion
25	Guadeloupe	/	DEN-2	0	-	0	-	-	2,270	1,686	nd	74,3	Sekundärinfektion
26	Guadeloupe	5	DEN-2	0	-	0	-	-	2,125	1,854	nd	87,2	Sekundärinfektion
27	ex-Kambodscha	4	DEN-3	10	2	0	-	-	0,201	0,146	nd	(72,4)	(Sekundärinfektion)
28	ex-Thailand/Indonesien	3	DEN-3	0	-	0	-	-	1,099	0,606	nd	55,2	Sekundärinfektion
Pand 2													

Tabelle 3.6-8: Ergebnisse des Aviditäts-ELISAs im Vergleich zu den Ergebnissen der anti-DENV NS1 IIFT-Inkubation. ELISA-Ergebnisse oberhalb des Cut-offs sind fettgedruckt, Aviditätsquotient von ELISA-Ergebnissen unterhalb des Cut-offs in Klammern. Reiserückkehrer wurden mit dem Vorsatz „ex-“ gekennzeichnet. -: nicht vorhanden; fettgedruckt: DENV-Serotyp entsprechend der PCR-Vorcharakterisierung bzw. positives ELISA-Ergebnis; rot: DENV-Serotyp, der nicht mit dem Serotyp per PCR übereinstimmt.

Insgesamt unterschieden sich die IIFT-Reaktivitäten in beiden Panels stark. Es waren elf Seren (91,7 %) des Panels 1 und nur vier Seren (25 %) des Panels 2 im IgM-IIFT NS1-reaktiv. Im IgG-IIFT zeigten sich Panel 1 ebenfalls elf Seren (91,7 %) und im Panel 2 sieben Seren (43,8 %) NS1-reaktiv.

Es wurden im IgM-IIFT nur zwei Serotypen überhaupt als reaktivste Serotypen gefunden: überwiegend DENV-2 (86,7 %) und seltener DENV-4 (20 %), wobei ein Serum mit beiden Serotypen reagierte. Im Panel 1 wurden mit dem IgM-IIFT insgesamt fünf Seren (45,5 %), im Panel 2 jedoch keine Seren entsprechend der PCR-Vortestung serotypisiert. Allerdings waren im Panel 2, wie schon erwähnt, überhaupt nur in 4 von 16 Seren IgM-Antikörper mit geringem Titer nachweisbar. Insgesamt zeigte sich, dass es bei Verwendung des rekombinanten Substrats mit dem IgM-IIFT nicht möglich war die Seren entsprechend der Vorcharakterisierung verlässlich zu serotypisieren. Für die endgültige Serotypisierung wurden daher nur die IgG-IIFT-Ergebnisse verwendet.

Im Panel 1 war bei sechs der elf reaktiven Seren (54,5 %) und im Panel 2 bei zwei der sieben reaktiven Seren (28,6 %) eine richtige Serotypisierung möglich. Die übrigen Seren reagierten entweder mit den NS1-Proteinen verschiedener Serotypen gleich stark oder mit einem anderen Serotyp. Generell war allerdings auch im IgG-IIFT eine unterschiedlich starke Reaktivität der Seren mit den verschiedenen Proteinen zu beobachten. Nur zwei Seren reagierten überhaupt mit dem DENV-3 NS1-Protein, zeigten allerdings im Vergleich zu den anderen Serotypen einen relativ geringen Titer. In der Inkubation mit dem anti-His und anti-DENV NS1-Antikörper zeigte sich bei dem DENV-3 Substrat ebenfalls eine geringere Reaktivität als bei den anderen Substraten. Betrachtet man dementsprechend im Panel 1 nur die Seren mit den DENV-Serotypen 1, 2 und 4, so konnten sechs von acht Seren (75 %) im IgG-IIFT richtig serotypisiert werden. Die zwei anderen Seren reagierten gleich stark mit einem weiteren Serotyp.

4 Diskussion

Derzeit wird die serologische Diagnostik seltener, arboviraler Infektionen nur von wenigen, spezialisierten Laboratorien angeboten. Ein Grund hierfür ist, dass kommerziell bis jetzt nur wenige Diagnostika für seltene Arboviren vorhanden sind und nur wenige Labore die Expertise haben *in-house* Tests zu etablieren und diagnostische Analysen durchzuführen. Da die meisten arboviralen Erregern in die biologische Sicherheitsstufe 3 oder 4 eingeordnet sind, setzt die Entwicklung dieser *in-house* Tests in der Regel den Umgang mit entsprechendem, infektiösen Material voraus. Dies ist nur in wenigen Laboren möglich. Zudem ist die Herstellung der Tests zeit- und arbeitsintensiv und erfordert ein spezielles Wissen. Vor allem aber sind umfangreiche Evaluierung der *in-house* Tests von den meisten Laboren nicht zu leisten. Es werden an kommerzielle diagnostische Tests viele weitere Qualitätsanforderungen gestellt, die die Labore für *in-house* Tests in der Regel nicht erfüllen können. Der hohe Level der Standardisierung der Produktionsabläufe in der Testproduktion, der durch die verschiedenen Qualitätskontrollen erreicht wird, ist der Hauptvorteil eines kommerziellen IIFTs. Durch die gleichbleibend hohe Qualität wird eine erhöhte Reproduzierbarkeit der Resultate erreicht, sowohl innerhalb eines Labors, wie auch zwischen verschiedenen Laboren [33,203,204].

Mit der wahrscheinlichen weiteren Ausbreitung der entsprechenden Arthropoden wächst die Gefahr, dass sich Arboviren in neuen geographischen Gebieten etablieren [134,163,205,206]. Einhergehend steigt damit auch der Bedarf an zuverlässigen Arbovirus-Diagnostika [207]. In Folge der CHIK-Epidemie im Indischen Ozean und nicht zuletzt durch den Ausbruch in Nord-Italien mit 217 Infizierten [48,49,50], ist in Deutschland und im restlichen Europa das Bewusstsein für die Möglichkeit einer CHIKV-Infektion gewachsen. Die im September 2010 entdeckten autochthonen Fälle von DEN und CHIK in Südfrankreich haben die Sorge bestärkt, dass in Europa auch in Zukunft immer öfter tropische Krankheiten detektiert und unter Umständen heimisch werden [51,208]. Aus reisemedizinischer Sicht, d.h. in nicht-endemischen Gebieten, handelt es sich bei den meisten Arbovirus-Infektionen im Moment um seltene Ereignisse. 2009 wurden dem Robert Koch-Institut z.B. insgesamt 298 Fälle einer nach Deutschland importierten DEN-Erkrankung, 54 Fälle einer CHIKV-Infektion und zwei Fälle einer CCHFV-Infektion gemeldet [209]. Dementsprechend selten wird in den Laboren die Diagnostik einer Arbovirusinfektion nachgefragt. Für diese geringen Serenzahlen ist grundsätzlich der IIFT besonders geeignet. Ein ELISA eignet sich eher zur Analyse größerer Probenzahlen, wie z.B. zur Untersuchung von Erkrankten in endemischen Gebieten, beim Screening von Blutspendern oder in speziellen Referenzzentren.

4.1 Generelle Herausforderungen der Testevaluierungen

Die für die Herstellung der IIFTs verwendeten Virenstämme waren größtenteils zuvor nicht genau molekular charakterisiert. Sie wurden daher, sofern keine Informationen vorhanden waren, sequenziert und phylogenetisch eingeordnet. Eine genaue Charakterisierung des verwendeten Substrats sollte einen gut evaluierten und CE-zertifizierten Test auszeichnen und jedem Nutzer serologischer Tests zugänglich sein. Diese Informationen können unter Umständen bei der Einordnung von unerwarteten, negativen oder schwach positiven diagnostischen Ergebnissen hilfreich sein.

Im Zuge der Evaluierungen der verschiedenen IIFTs wurden häufig die Ergebnisse des IIFTs mit denen eines ELISAs verglichen und meist zeigten die ELISAs geringfügig bessere Sensitivitäten als die IIFTs. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass beide Testsysteme auf unterschiedlichen Grundprinzipien basieren. So unterscheiden sich u.a. die Art der Präsentation, die Zugänglichkeit, sowie die Konzentration der Antigene. Beim ELISA kann z.B. pro Serumvolumen mehr Antigen angeboten werden, was die Empfindlichkeit des Testes erhöhen kann. Der Vorteil des IIFTs ist jedoch, dass er sehr schnell durchzuführen ist, da die Inkubation nur 1,5 h dauert. Die Seren können parallel auf bis zu neun Substraten in einem Reaktionsfeld inkubiert und die Antikörper-Reaktionen mit diesen Substraten direkt verglichen werden. Zudem ist es mit dem IIFT möglich, unspezifisch reagierende Seren durch die Reaktion mit nicht infizierten Kontrollzellen zu detektieren. Allerdings erfordert die Auswertung der IIFTs das Vorhandensein eines Fluoreszenzmikroskops und Erfahrung mit der IIFT-Technik.

Grundsätzlich sollte ein neuer Test immer an den bereits vorhandenen Testen gemessen werden. Wenn nun allerdings ein neuer Test zum Beispiel mit einem weniger sensitiven Test verglichen wird, wird er viele „falsch positive“ Seren detektieren, die aber eigentlich nachweisbare Antikörper haben. Somit berechnet sich für den neuen Test eine geringere Spezifität, die jedoch nicht der Wirklichkeit entspricht. Um dies zu verhindern und die Ergebnisse richtig deuten zu können, wurden in den Evaluierungen zu den Vorwerten durch den Vergleichstest, wenn möglich auch noch weitere klinische Informationen wie der Abnahmezeitpunkt des Serums nach Symptombeginn oder mögliche PCR-Resultate erhoben. Wenn möglich wurden die Tests zudem gegenüber mehreren anderen Testen evaluiert.

Im Allgemeinen ist die Akquirierung von Probenkollektiven seltener Erkrankungen eine Herausforderung und oft kann nicht auf frische Serumproben zurückgegriffen werden, sondern auf eine Sammlung von Proben aus mehreren Jahren. Es zeigte sich in den durchgeführten Studien, dass es von großer Bedeutung ist, dass die Serumproben, wenn

möglich, parallel im zu evaluierenden Test und im Vergleichstest analysiert werden. Die Lagerung der Seren hat einen großen Einfluss auf die Stabilität der Antikörper, so ist z.B. beschrieben, dass sich die Antikörperreaktivität bei einer Lagerung bei -20 °C über die Zeit reduzieren kann [210]. Zusätzlich können mehrere Aliquots der gleichen Seren angefertigt werden, die jeweils nur einmal verwendet werden. Dadurch werden wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen vermieden.

4.2 Evaluierung des anti-Chikungunya-Virus IIFTs

Die Zunahme der CHIKV-Infektionen in den letzten Jahren hat die Notwendigkeit der Entwicklung von guten und reproduzierbaren Testen zur Diagnose einer CHIKV-Infektion aufgedeckt. [59,60]. Der vorliegende IIFT ist der erste kommerziell erhältliche Test zur Detektion von CHIKV-spezifischen Antikörpern. Er weist vergleichbare Resultate mit *in-house* Testen verschiedener Labore auf und zeigt insgesamt eine Sensitivität von 97 % und eine Spezifität von 98,3 % im IgM-IIFT bzw. 95,4 % und 100 % im IgG-IIFT.

Aus dem Panel 1 waren drei IgM-ELISA positive Seren im IgM-IIFT nicht positiv. Eines der Seren war einen Tag nach Einsetzen der Symptome entnommen worden und PCR-positiv. Da man davon ausgeht, dass der IgM-Titer bei gerade einsetzenden Symptomen weiter ansteigt, ist es wahrscheinlich, dass ein konsekutives Serum im IgM-IIFT, sowie im IgG-IIFT ein positives Resultat gezeigt hätte [57]. Die Seren der anderen beiden Patienten waren zehn Tage nach Einsetzen der Symptome entnommen, hatten jedoch ebenfalls im IgM-ELISA sehr niedrig positive ODs und waren im IgG-ELISA negativ. Dieser niedrige IgM-Titer war mit dem IIFT nicht detektierbar.

Bei der Analyse der ELISA-negativen Proben wurden mit dem IgM-IIFT 21,1 % der Seren und mit dem IgG-IIFT 18,3 % der Seren als positiv detektiert. Der IIFT zeigte also in diesen Seren eine höhere Sensitivität als der ELISA.

Diese Unterschiede in der Reaktivität zwischen dem *in-house* CHIKV IgM-ELISA und dem kommerziellen IIFT können möglicherweise auf die Präsentation des jeweiligen Antigens zurückzuführen sein, d.h. also in und auf den Zellen bzw. auf der ELISA-Platte. Zudem unterscheiden sich die Teste in den Reaktionsbedingungen und durch die unterschiedlichen Virusstämme, die für die Herstellung der verschiedenen Teste verwendet wurden.

Im Panel 2 konnten mit dem kommerziellen anti-CHIKV IgM- bzw. IgG-IIFT ein IgM-positives Serum und vier IgG-positive Seren nicht detektiert werden. Die vier Seren, die im IgG-IIFT als negativ gefunden wurden, zeigten jedoch eine CHIKV-spezifische Immunantwort im IgM-IIFT. Dies würde eine Identifikation der akuten CHIKV-Infektion in den Patienten gewährleisten.

Die Unterschiede zum *in-house* IIFT könnten ebenfalls auf den unterschiedlichen Virusstämmen beruhen, sowie auf die Lagerung der Seren, da die Teste nicht zur gleichen Zeit durchgeführt wurden. Beide IIFTs basierten zudem auf unterschiedlichen Protokollen, Inkubationsbedingungen und Detektionsantikörpern, wodurch es ebenfalls zu den gefundenen Differenzen gekommen sein könnte.

Aus dem CHIKV-Negativpanel 3 zeigten zwei Blutspender im IgM-IIFT eine positive Reaktion mit einem Titer von 1:100. Bei keiner dieser Personen war eine aktuelle, relevante Reisehistorie bekannt. Allerdings sind anti-CHIKV IgM-Titer bei einem großen Anteil der Patienten bis mindestens 18 Monate nach einer Infektion nachweisbar [58] und auch die IgM-Titer gegen andere Alphaviren, wie z.B. Sindbis-Viren, können lange Zeit persistieren [211]. Es wäre also möglich, dass die Blutspender auf einer vorangegangenen Reise, die längere Zeit zurückliegt und in den Fragebögen der Blutspendedienste nicht erfasst wird, inapparent mit dem CHIKV oder einem anderen Alphavirus infiziert waren. Sindbis-Viren kommen z.B. in Schweden und Finnland vor, wo es regelmäßig zu humanen Erkrankungen kommt [212]. Vor Kurzem wurden Sindbis-Viren auch in Deutschland in Stechmücken nachgewiesen [213].

Die Differentialdiagnose einer DENV- und CHIKV-Infektion ist symptomatisch nicht möglich, da sich die klinischen Bilder beider Erkrankungen sehr ähneln. Die Diagnostik beruht demnach vor allem auf den Laborergebnissen [214]. Im anti-CHIKV IIFT wurden keine Kreuzreaktivitäten mit den Seren DENV-Infizierter gefunden. Mittels des IIFT können demnach Antikörper gegen beide Viren eindeutig unterschieden werden. Um eine akute, primäre von einer zurückliegenden CHIKV-Infektion zu unterscheiden, sollte, zumindest in endemischen Ländern, nicht nur auf anti-CHIKV IgM sondern auch auf IgG getestet werden. Da, wie zuvor erwähnt, die anti-CHIKV IgM-Antikörper mehr als ein Jahr persistieren können [58], ist es wichtig den IgG-Status von frühen klinischen Proben zu kennen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass beide Antikörperklassen relativ früh nach Symptombeginn und beinahe gleichzeitig detektierbar sind [57]. Im Falle einer IgG-Detektion, könnte sich daher eine Bestimmung der Avidität als nützlich erweisen. Die Möglichkeit einer Differenzierung einer akuten Infektion von einer IgG-Persistenz mittels Aviditätsuntersuchung ist mit dem EUROIMMUN anti-West-Nil-Virus IIFT [215] gezeigt worden. Da beide Teste auf einer ähnlichen Testplattform beruhen, sollte eine Aviditätstestung prinzipiell auch mit dem anti-CHIKV IIFT möglich sein.

Zusätzlich wurden die Veränderungen der ELISA-Werte des CHIKV-Kollektivs 1 nach einer zweijährigen Lagerung analysiert. Es zeigte sich, dass die Lagerung der Seren einen großen Einfluss auf die Stabilität der Antikörper im generellen, vor allem aber der IgM-Antikörper, hatte. Die Seren wurden für einige Zeit im Kühlschrank aufbewahrt, sowie

mehrfach eingefroren und aufgetaut, wodurch Antikörper zerstört werden können. IgM als Pentamer scheint besonders empfindlicher gegenüber einer längeren Lagerung unter nicht idealen Bedingungen zu sein [210].

4.3 Evaluierung des anti-Japanische Encephalitis-Virus IIFTs und Untersuchung des Verlaufs der Immunantwort nach Impfung gegen Japanische Encephalitis

Bei dem anti-JEV IIFT handelt es sich um den ersten kommerziell erhältlichen IIFT zur Detektion von Antikörpern gegen JEV. Er sollte mit einem Serumpanel von JE-Geimpften im Vergleich zu zwei verschiedenen kommerziellen IgM-*capture* Testen, einem kommerziellen IgG-ELISA und dem PRNT50 evaluiert werden.

Die beiden IgM-*capture* ELISAs wurden für die Evaluierung ausgewählt, da beide Teste relativ weit verbreitet in Laboren angewendet werden. Bei der Evaluierung des anti-JEV IgM-IIFTs zeigte dieser generell vergleichbare Ergebnisse zu den IgM-*capture* ELISAs. Die Spezifität und Sensitivität des IgM-IIFTs war, verglichen mit dem Panbio IgM-ELISA bei 95,1 % bzw. 86 % und mit dem InBios IgM-ELISA bei 100 % bzw. 83,9 %. Im Vergleich zum PRNT50 zeigte der IgG-IIFT eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 93,8 %.

Die Unterschiede in der Spezifität des IIFTs im Vergleich zum Panbio ELISA und die übereinstimmenden Resultate im Vergleich zum InBios ELISA, könnten auf Unterschiede in der Sensitivität der entsprechenden ELISAs zurückzuführen sein. Der Panbio ELISA zeigte in der publizierten Evaluierungsstudie beider ELISAs mit 89,3 % eine geringere Sensitivität als der InBios ELISA, der eine Sensitivität von 99,2 % hatte [196].

Beide IgM-*capture* ELISAs waren im direkten Vergleich sensitiver als der IgM-IIFT. Dieses Phänomen wurde ebenso in Evaluierungen anderer IIFTs beobachtet. Alle Teste konnten jedoch eine ähnliche Anzahl von PRNT50-positiven Seren als positiv detektieren, allerdings nicht die gleichen Seren. Dies könnte ebenfalls durch das unterschiedliche Testprinzip und damit die unterschiedliche Präsentation der Antigene erklärt werden. Es wäre z.B. denkbar, dass für einige IgM-Moleküle, aufgrund ihrer Größe (900 kDa) oder ihrer Struktur, einige der im IIFT intrazellulär vorliegenden Antigene, schlechter zugänglich sind als Antigene auf der Oberfläche einer ELISA-Platte, und umgekehrt. Die ELISAs und der IIFT unterschieden sich zudem durch die verwendeten Virusstämme bzw. Antigene. Während beim IIFT virusinfizierte Zellen eingesetzt wurden, basierten beide ELISAs auf verschiedenen rekombinanten Antigenen.

Insgesamt repräsentiert der IgM-IIFT eine weitere diagnostische Methode, die schnell durchzuführen ist und qualitativ gute Ergebnisse liefert.

Der anti-JEV IgG-IIFT zeigte 56 Tage nach Impfung der Probanden eine dem PRNT50 vergleichbare Sensitivität, ist jedoch wesentlich leichter und einfacher durchzuführen als

der zeitintensive PRNT50. Im Vergleich dazu zeigte der InBios IgG-ELISA in dieser Studie eine inadäquate Detektion von PRNT50-positiven Seren. Mit diesem Test ist es demnach nicht möglich verlässlich eine Antikörperantwort nach Impfung nachzuweisen.

Auch wenn die letztendlich protektive Immunität nur mit dem Neutralisationstest bestimmt werden kann [216], ist der IgG-IIFT eine mögliche Alternative, um eine anti-JEV IgG-Antwort nach Impfung zu analysieren. Dies ist sehr hilfreich, um schnell den anti-JEV Impfstatus in Reisenden zu überprüfen, z.B. wenn diese nach einem Schnellimpfschema geimpft wurden [217]. Außerdem kann die Serokonversionsrate nach Impfung z.B. bei Älteren oder HIV-Infizierten reduziert sein und bedarf unter Umständen einer Prüfung [218,219,220,221].

Ein generelles Problem des serologischen Nachweises von Flaviviren ist das gleichzeitige Vorhandensein von kreuzreaktiven, anti-Flavivirus Antikörpern aus zurückliegenden Infektionen und Impfungen. Daher wurde die Intensität der Detektion von kreuzreaktiven Antikörpern mit dem IIFT in verschiedenen Serumkollektiven untersucht. Das Flavivirus Profil 2 (bestehend aus BIOCHIPs mit JEV, DENV, Frühsommer-Meningoencephalitisvirus, West-Nil-Fiebertivirus und Gelbfieber-Virus) wurde verwendet, um die Stärke der Kreuzreaktivität gegen andere Flaviviren zu bestimmen, die mit dem IIFT in den Seren der JE-geimpften Personen gefunden wurde. In acht von zehn Seren wurde im IgM-IIFT keine Kreuzreaktivität gegen andere Flaviviren detektiert. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Literatur beschrieben [222]. Im IgG-IIFT hingegen zeigte sich eine sehr starke Kreuzreaktivität. Jedoch war die Reaktivität der IgM- und IgG-Antikörper mit den anderen Flavivirus IIFT-Substraten generell niedriger, als die Reaktion mit dem JEV-Substrat.

Auch in dem Kollektiv von anti-DENV-positiven Seren war die geringere Kreuzreaktivität der IgM-Antikörper zu beobachten. Sowohl im ELISA als auch im IIFT waren die IgM-Antikörper weniger kreuzreaktiv als die IgG-Antikörper. Im IgM-IIFT z.B. wurden in 20 % der DENV-positiven Seren kreuzreaktive Antikörper gefunden, im IgG-IIFT jedoch in allen Seren. Diese unterschiedliche Stärke der detektierten Kreuzreaktivitäten könnte möglicherweise durch die Höhe der Titer erklärt werden. Generell waren die IgG-Titer höher als die IgM-Titer: Im anti-JEV Panel durchschnittlich 1:320 vs. 1:32 und im anti-DENV Panel durchschnittlich 1:1000 vs. 1:32. Die Unterschiede in der Antikörperreaktion zwischen den einzelnen Flaviviren sind sehr gering. Möglicherweise werden diese geringen Unterschiede bei höheren Titern eher überlagert und können daher besser im Vergleich zu relativ geringen als im Vergleich zu höheren Titern detektiert werden.

Der Vergleich der Resultate des DENV-Kollektivs in allen drei IgM-Testen zeigt, dass auch bei der Verwendung von rekombinantem Antigen, wie im Panbio und InBios ELISA, noch eine Kreuzreaktivität nachweisbar ist. Während der Panbio IgM-ELISA nur ein Serum

falsch-positiv diagnostizierte, wurden im InBios IgM-ELISA immerhin die Hälfte der DENV-positiven Seren fälschlicherweise als anti-JEV IgM-positiv diagnostiziert. Diese hohe Kreuzreaktivität, des InBios ELISAs von 56,1 %, war zuvor auch schon in einer anderen Studie festgestellt worden [196]. Die Resultate zeigen, dass es wichtig ist, in Gebieten in denen sowohl JEV wie auch DENV endemisch sind gleichzeitig zumindest auf spezifische JEV- und DENV-Antikörper zu testen [70], wie das im Panbio ELISA und im Flavivirus Profil 2 möglich ist.

Der Nachweis von anti-JEV IgM- und IgG-Antikörpern in den Seren von Blutspendern aus der norddeutschen Bevölkerung kann durch kreuzreaktive Antikörper gegen andere Flaviviren, wie z.B. durch eine Impfung gegen das FSME-Virus erklärt werden [223]. In Schleswig-Holstein z.B. haben 2,5 % der Kinder im Alter von 25 Monaten schon mindestens eine Impfung gegen FSME erhalten (Dr. H.-M. Bader, persönliche Mitteilung). Daher muss man auch bei Reisenden aus Gebieten, ohne natürliches JEV- und DENV-Auftreten in Betracht ziehen, dass die serologische Reaktion gegen andere Flaviviren zu positiven Testresultaten führen kann. Zusätzlich muss natürlich bei Reisenden, die aus Dengue-endemischen Gebieten kommen, das Auftreten von anti-DENV Antikörpern in Betracht gezogen werden.

Im Zuge der JEV-Studie wurde auch der Verlauf der spezifischen Antikörper nach JE-Impfung mit dem IIFT bestimmt. Insgesamt haben nur etwa 33 % der Geimpften eine im IIFT messbare IgM-Antwort gezeigt. Daher sollte, falls eine anti-JEV Titerbestimmung nach JEV-Impfung angezeigt ist, auf IgG und nicht auf IgM getestet werden. Da der IgG-Titer am Tag 28 nach Impfung mit 18 % der Geimpften noch relativ gering ist, sollte erst nach dem Tag 35 nach Impfung (90,8 % der Geimpften IgG-positiv) getestet werden.

Es ist zu erwarten, dass in akut infizierten Personen mehr Seren IgM- und/oder IgG-positiv sind, da die serologische Immunantwort nach einer Infektion um ein Vielfaches stärker ist. Dies sollte jedoch mit einem Panel von natürlich JEV-infizierten Personen evaluiert werden.

Für die Diagnose einer frühen JEV-Infektion, wäre es möglich einen Test zur NS1-Antigen-Detektion zu entwickeln. Dies hat sich bei der DENV-Diagnostik als sehr hilfreich erwiesen, da bei DENV-Infektionen NS1 sehr früh zu detektieren ist, und noch vor IgM und bis zu 9 Tage nach Beginn der Symptome gemessen werden kann. Die diagnostische Sensitivität in den frühen Stadien einer DENV-Infektion konnte durch die Kombination der NS1- und IgM-Bestimmung wesentlich erhöht werden [224].

Insgesamt zeigte der neue EUROIMMUN anti-JEV IIFT vergleichbare Resultate zu den bisher verfügbaren kommerziellen IgM-*capture* ELISAs und dem PRNT. Damit ist der IIFT ein wertvolles Werkzeug zur Bestimmung der Immunantwort nach Impfung in Reisenden

und Personen aus endemischen Gebieten und er könnte sich in der Diagnose von akut infizierten Patienten als nützlich erweisen.

4.4 Evaluierung des anti-Dengue-Virus Mosaik IIFTs

Da bei dem anti-DENV Mosaik IIFT, im Gegensatz zu anderen kommerziell vertriebenen Testen, alle vier Serotypen präsentiert werden und somit eine Titerbestimmung für jeden der vier verschiedenen Serotypen durchgeführt wird, sollte getestet werden, ob dieses System eine Serotypisierung erlaubt. Daher sollte der Test mit zwei Panels untersucht werden, bei denen der Serotyp der Infektion per PCR bestimmt worden war.

Auch in dieser Analyse, wie schon bei der IgM-Antikörper-Bestimmung mit dem Flavivirus Profil 2 im Rahmen der anti-JEV IIFT-Evaluierung (siehe 3.2.1), zeigte sich, dass die IgM-Antikörper spezifischer binden und weniger kreuzreagieren [222,225], und zwar nicht nur bei unterschiedlichen Viren der gleichen Familie, sondern auch bei unterschiedlichen Serotypen einer Virusart, die eine noch geringere Antigen-Differenz aufweisen. Aufgrund dieser Tatsache eignen sich die IgM-Antikörper besser als die IgG-Antikörper für eine Serotypisierung und wurden bei diskrepanten Ergebnissen stärker bewertet.

Die anti-DENV-positiven Seren des Panels 1 waren ausschließlich konsekutive Seren von Patienten mit einer DENV-Primärinfektion, die zuvor per PCR serotypisiert worden waren. Per IIFT gelang insgesamt eine Serotypisierung in 58,3 % der Seren.

Bei einem Serum des Panels 1 wurde ein anderer Serotyp mittels IgM detektiert als in der PCR. Es waren keine weiteren Informationen zu diesem Serum zu erhalten, außer dass es von einem Patienten stammt, der 2006 in Indien war. Es ist unklar, ob der Patient unter Umständen eine DENV-Doppelinfektion hatte. 2006 gab es in Delhi, Indien eine große DENV-Epidemie mit allen vier DENV-Serotypen, bei denen bei einer großen Anzahl von Personen eine Doppelinfektion gefunden wurde, meist mit DENV-1 und DENV-3, wie auch bei Serum Nr. 10 [226,227]. Nicht auszuschließen ist jedoch auch eine Verwechslung der PCR-Resultate bzw. der Proben beim Aliquotieren.

Die Seren des Panels 2 zeigten eine sehr frühe und zum Teil sehr hohe IgG-Antwort. In der Regel sind bei einer Primärinfektion ca. 6 - 7 Tage nach Symptombeginn zunächst geringe IgG-Titer nachweisbar, die dann langsam ansteigen. IgM-Antikörper sind bei 50 % der Patienten am 3 - 5. Tag nachweisbar. Sie steigen dann weiter an, aber erst am Tag 10 sind 99 % der Patienten IgM-positiv. Eine Sekundärinfektion hingegen ist durch das Vorliegen von IgG-Antikörpern zum Teil schon am ersten Tag nach Symptombeginn, sowie einen raschen Anstieg des IgG-Titers gekennzeichnet. Meist ist der IgM-Titer niedriger als der IgG-Titer und zum Teil nicht detektierbar [5,198]. Per Aviditäts-ELISA kann man eine Primär- von einer Sekundärinfektion unterscheiden.

Da die Seren des Panels 2 Hinweise auf eine Sekundärinfektion zeigten, wurden sie im Aviditäts-ELISA untersucht. 87,5 % der Seren waren höchstwahrscheinlich bei einer Sekundärinfektion entnommen worden. Die Bestimmung der Avidität per ELISA zeigt generell eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 82 % [111]. Die IgG-Antikörper von Seren mit einem Aviditätsquotient < 50 % sind demnach mit 100 %iger Wahrscheinlichkeit tatsächlich niedrig-avide, was z.B. für das Serum Nr. 20 zutrif. Allerdings besteht bei Seren mit einem Aviditätsquotient > 50 % eine 18 %ige Wahrscheinlichkeit nicht hoch-avide zu sein [111]. Eine letztendlich definitive Aussage war daher aufgrund dieser ELISA-Ergebnisse nicht möglich. Zur weiteren Einordnung der Ergebnisse wurden aber alle vorhandenen Daten mit einbezogen: der Abnahmezeitpunkt des Serums, die IgG- und IgM-Antikörperkonzentrationen, sowie der Aviditätsquotient. Damit konnte in den meisten Fällen ein nachvollziehbares Bild des Infektionszeitpunkts und -hergangs konstruiert werden.

Generell geht man davon aus, dass bei einer Sekundärinfektion die Bestimmung des Serotyps im Vergleich zu einer Primärinfektion erschwert ist, da eine komplette Immunreaktion gegen einen anderen Serotyp bereits abgelaufen ist. Einige der reaktivierten Gedächtniszellen produzieren Antikörper, die sowohl gegen den Serotyp der ersten wie auch gegen den der zweiten Infektion gerichtet sind und somit die Serotypisierung des zweiten Serotyps stark beeinflussen können.

Insgesamt ist dementsprechend bei dem Panel 2, das höchstwahrscheinlich vor allem aus Seren aus Sekundärinfektionen bestand, die Rate der richtig serotypisierten Seren niedriger als im Panel 1: 37,5 % zu 58,3 %.

Es gibt jedoch Hinweise, dass bei der IgM-Bestimmung dieser Effekt nicht so ausgeprägt ist [228]. Wenn nur diese, möglicherweise spezifischere IgM-Bestimmung zu Grunde gelegt wird, liegt bei Panel 1 die Rate der richtig serotypisierten Seren bei 50 % und im Panel 2 weiterhin bei 37,5 %. Allerdings wurde in drei der 16 Seren des Panels 2 kein IgM detektiert. Von den IgM-positiven Seren des Panels 2, konnten 6 der 13 Seren (46,2 %) richtig serotypisiert werden. Bei zwei dieser 13 Seren handelte es sich allerdings wahrscheinlich um Seren einer Primärinfektion. Wenn man diese beiden Seren nicht mit betrachtet, bleiben 5 von 11 Seren (45,5 %), die per IgM-IIFT richtig serotypisiert wurden und höchstwahrscheinlich einer Sekundärinfektion entstammen. Bei dieser IIFT-Bestimmung zeigte sich also, dass sich mit der IgM-Analyse bei ca. 50 % der Seren, und zwar unabhängig davon, ob sie einer Primär- oder Sekundärinfektion entstammten, der richtige Serotyp ermitteln ließ.

Das immunologische Gedächtnis beruht zwar sowohl auf IgG-, wie auch auf IgM-Gedächtniszellen [229,230,231], aber die IgM-Gedächtniszellen dienen vor allem als ein

Repertoire für den Aufbau neuer Keimzentrumsreaktionen und damit von IgG-produzierenden Zellen [232]. Dementsprechend ist die IgG-Antwort bei einer Sekundärinfektion die quantitativ vorherrschende und die IgM-Antikörper können zum Teil vollkommen fehlen. Es bleibt unklar, ob bei einer Sekundärinfektion bei der IgM detektiert wird, selektiv vor allem jene IgM-Gedächtniszellen aktiviert werden, die dem Serotyp der akuten Sekundärinfektion entsprechen (und daher weniger Primärinfektionsspezifische IgM-Antikörper vorliegen), oder ob die detektierten IgM-Antikörper von neu aktivierten, naiven B-Zellen stammen, die während der Primärinfektion nicht aktiviert wurden.

In anderen Studien in denen die Seren mittels *in-house* IgM-ELISAs serotypisiert wurden, konnten jedoch in Primärinfektionen mehr Seren korrekt serotypisiert werden als in Sekundärinfektionen [113]. Es sollten daher weitere IIFT-Studien mit größeren, charakterisierten Serumpaneln von Primär- und Sekundärinfektionen angeschlossen werden, um die Ergebnisse der Serotypisierung per IgM-IIFT zu verifizieren.

In den Seren in denen keine eindeutige Serotypisierung möglich war, zeigte sich, dass in beiden Panels (jeweils mit Ausnahme eines Serums) der krankheitsverursachende Serotyp unter den am stärksten reaktiven Serotypen war. Dementsprechend kann man, wenn keine Serotypisierung möglich ist, unter Umständen zumindest einzelne Serotypen als Infektionsursache ausschließen.

Es wurde im Weiteren die Möglichkeit der Serotypisierung mit dem IgG-IIFT betrachtet: Generell zeigten vier Seren des Panels 2 eine spezifische IgG-Reaktion gegen nur einen Serotyp (drei wurden dann aber aufgrund des IgM-Ergebnisses serotypisiert, nur Nr. 15 nicht). Davon stimmten zwei Seren (Nr. 13 und 27) mit dem per PCR bestimmten Serotyp überein und zwei nicht (Nr. 15 und 28). Höchstwahrscheinlich entsprechen die Serotypen, die in Serum 15 und 28 per IgG-IIFT detektiert wurden, den Serotypen der Primärinfektion. Bei Serum Nr. 28 konnte mit dem IgM-IIFT der Serotyp der aktuellen Infektion bestimmt werden, bei Nr. 15 war dies nicht möglich.

Die Seren Nr. 13 und 27 zeigten die stärkste Reaktion mit dem Serotyp der akuten Infektion. Dies könnte entweder darauf zurückzuführen sein, dass es sich doch um eine Primärinfektion handelte (beide Seren zeigten relativ niedrige ELISA-Titer), oder es zu einer Sekundärinfektion mit dem gleichen Serotyp gekommen ist. Dies ist allerdings selten der Fall, da man nach einer Infektion in der Regel von einer lebenslangen Immunität gegen den krankheitsverursachenden Serotyp ausgeht [233]. Es könnte jedoch auch sein, dass vor allem die IgG-Gedächtniszellen aktiviert werden, die spezifisch an den krankheitsverursachenden Serotyp der Sekundärreaktion binden und weniger die

kreuzreaktiven Zellen. In beiden Seren war auch per IgM-IIFT eine eindeutige Serotypisierung der akuten Infektion möglich.

Unter Umständen sollte daher bei früh detektiertem IgG und einer möglichen Sekundärreaktion auf die Serotypisierung per IgG-IIFT verzichtet werden, da sie zu falschen Ergebnissen führen kann. Auch dies sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Der Vorteil der Mosaik IIFT-Plattform ist, dass alle Serotypen gleichzeitig unter den gleichen Bedingungen mit einer Serumverdünnung inkubiert werden. Die Antikörper binden demnach am stärksten an den Serotyp, der am ehesten dem Virus entspricht, der die Immunreaktion ausgelöst hat. Unterschiede aufgrund von Abweichungen bei den Verdünnungen oder den Inkubationszeiten werden durch die identischen Inkubationsbedingungen zum großen Teil ausgeschlossen.

Um die Ergebnisse des anti-DENV IIFTs richtig zu beurteilen und die Seren zu serotypisieren, ist es notwendig zu wissen, ob es sich um eine Primär- oder Sekundärinfektion handelt. In diesem Fall wurde der ELISA zur Aviditätsuntersuchung herangezogen, prinzipiell ist es jedoch auch möglich einen IIFT für eine Aviditätsbestimmung zu verwenden und wurde mit dem anti-West-Nil-Virus IIFT bereits demonstriert [215]. Dies müsste für den konventionellen anti-DENV IIFT ebenfalls untersucht werden. Da beide IIFTs auf dem gleichen Prinzip beruhen, ist mit vergleichbaren Ergebnissen zu rechnen.

Weiterhin wird von immer mehr Anwendern eine Ratio aus dem IgM- und IgG-Titer im ELISA gebildet und aufgrund dieser Ratio die Unterscheidung zwischen Primär- und Sekundärinfektion gemacht. Auch das könnte mit größeren Serumpanels mit dem IIFT ausgetestet werden.

Die vorliegende Analyse zeigt die Möglichkeiten auf, die der anti-DENV IIFT im Rahmen der Serotypisierung bietet. Eine mögliche Serotypisierung bringt zum einen Klarheit für den Patienten und den behandelnden Arzt, könnte allerdings auch Aufklärung für einige offene epidemiologische Fragen bringen, z.B. wie hoch der Prozentsatz von Antikörpern gegen andere Serotypen in Patienten mit einer schweren DENV-Erkrankung ist [113,117]. Mit dem evaluierten IIFT kann in der Hälfte der Seren eine korrekte Serotypisierung erreicht werden. In einer großen Anzahl der übrigen Seren können einzelne DENV-Serotypen als Infektionserreger ausgeschlossen werden.

Der IIFT-Test sollte jedoch noch mit weiteren, größeren und gut charakterisierten Serumpanels von Primär- und Sekundärinfektionen aus nicht-endemischen, wie auch aus endemischen Gebieten evaluiert werden. Zudem sollten Serumpanels untersucht werden

bei denen eine Immunität gegen andere Flaviviren vorliegt, um zu sehen inwieweit sich dies auf die Serotypisierung auswirken kann.

Die für die Serotypisierung nötige Bestimmung der feinen Fluoreszenzunterschiede der einzelnen DENV-IIFT-Substrate ist nicht einfach und erfordert eine gewisse Erfahrung in der Analyse von IIFT-Ergebnissen. Es könnte sich aber in Zukunft die Möglichkeit bieten die IIFT-Auswertung zu automatisieren. Entsprechende Schritte werden von der Firma EUROIMMUN unternommen. Diese automatisierte IIFT-Analyse ist bei den heterogenen Bildern von Antikörperantworten nach Infektionen technisch anspruchsvoll, dennoch kann man höchstwahrscheinlich davon ausgehen, dass eine Maschinen-gestützte Bewertung bei der Unterscheidung von Fluoreszenzstärken eine höhere Sensitivität als das menschliche Auge erreichen kann und somit die Serotypisierung mit diesem IIFT weiter verbessert werden kann.

4.5 Evaluierung des anti-Sandfliegen-Fieber-Viren Mosaik IFTs

Zur Diagnose der SFV existieren weltweit nur drei kommerzielle Teste, der anti-SFV Mosaik IIFT, ein anti-TOSV ELISA und ein anti-TOSV Blot. Diese Teste sollten im Rahmen der Untersuchung von türkischen Blutspenderseren verglichen werden. Außerdem sollte die Möglichkeit analysiert werden mit dem anti-SFV Mosaik IIFT die verschiedenen Serotypen zu unterscheiden.

Es wurde ein statistisch signifikanter Trend festgestellt, wonach die Seren, die mit mehreren IIFT-Substraten reagierten, eine höhere mittlere Fluoreszenzstärke in der 1:100 Verdünnung aufwiesen. Möglicherweise ist im IIFT bei einem höheren IgG-Antikörpertiter mit einer höheren Kreuzreaktivität zu rechnen.

Im Panel T konnte mit dem anti-TOSV ELISA nur in 10,9 % der Seren eine grenzwertige ELISA-OD gemessen werden und nur 30,4 % der Seren reagierten positiv mit dem Blot. Hingegen wurden vor allem Seren aus dem Panel NT, also Seren, die mit dem SFNV- und dem TOSV-IIFT-Substrat positiv waren, mit dem ELISA und dem Blot als anti-TOSV-positiv diagnostiziert. 28 % der Seren waren im ELISA positiv und 98 % im Blot. Der höhere Antikörpertiter, der mit dem IIFT im Panel NT im Gegensatz zum Panel T gemessen wurden, könnte ebenfalls der Grund für die stärkere Reaktion des anti-TOSV ELISAs und Blots mit diesem Panel sein.

Zwischen dem TOSV und dem SFNV ist eine hohe Kreuzreaktivität beschrieben worden [234] und entsprechend kreuzreaktiv reagierten die Seren des Panels N mit dem Blot. 81,8 % der Seren zeigten eine positive Reaktion, d.h. wesentlich mehr als im Panel T. Im ELISA wurde allerdings keine Kreuzreaktivität mit den, im IIFT anti-SFNV-positiven, Seren gefunden. Interessanterweise reagierte das rekombinante TOSV-Nukleoprotein des ELISAs

jedoch mit einzelnen Seren des Panels S und Panels SC. Auch im Blot konnte in diesen Panels eine leichte Kreuzreaktivität gefunden werden (ca. 15 - 17 %).

Insgesamt konnte also durch die verwendeten, rekombinanten Proteine eine Kreuzreaktivität mit den anderen SFV-Stämmen nicht unterbunden werden. Dies konnte auch in vorhergehenden Studien gezeigt werden [178,179,235]. Allerdings zeigten die im ELISA und im Blot verwendeten Nukleoproteine eine unterschiedliche Kreuzreaktivität. Dies ist unter Umständen auf die unterschiedlichen Virusstämme zurückzuführen oder aber auf die Art und Weise der Präsentation im ELISA und im Blot.

Der IIFT offenbart in diesem Zusammenhang den entscheidenden Vorteil, dass alle vier europäischen Stämme parallel getestet und Kreuzreaktivitäten entsprechend detektiert und eingeordnet werden können.

Insgesamt zeigte der Vergleich der Werte des anti-SFV IIFT mit den Werten des anti-TOSV ELISAs und des anti-TOSV Blots, dass mit dem anti-SFV IIFT wesentlich mehr Seren positiv diagnostiziert wurden als mit den anderen beiden Testen. Möglicherweise ist der Unterschied durch die verschiedenen verwendeten Antigene bedingt. Während im ELISA und im Blot nur Teile des Virus, nämlich rekombinante Nukleoproteine des TOSV eingesetzt wurden, so wurden im IIFT die Virus-Vollantigen-Substrate der vier SFV-Serotypen verwendet. Möglicherweise kommen zudem in der Türkei SFV-Stämme vor, die sich von den bisher bekannten SFV-Stämmen unterscheiden und dadurch die Antikörper durch die verschiedenen Teste unterschiedlich gut erkannt wurden.

Durch die hohe Sensitivität bietet sich der anti-SFV Mosaik IIFT als Screening-Test an. Die Ergebnisse sollten jedoch mit einem spezifischen Test, bestmöglich dem Neutralisationstest überprüft werden. In der Vergangenheit ist der anti-TOSV ELISA im großen Maße für verschiedene Seroprävalenzstudien verwendet worden [177,236,237]. Die Ergebnisse der Evaluation legen nahe, dass diese Studien mit dem sensitiveren anti-SFV IIFT überprüft werden sollten, da bei der Verwendung des anti-TOSV ELISAs höchstwahrscheinlich die tatsächliche SFV-Prävalenz stark unterschätzt worden ist.

Da es sich bei dieser Evaluierung um Seren aus einer Seroprävalenzstudie in Blutspendern handelt, zeigten die Seren höchstwahrscheinlich einen, im Vergleich zu akut Erkrankten, geringen Antikörpertiter. Der anti-SFV IIFT sollte demnach zusätzlich mit Seren von infizierten Patienten getestet werden, um zu sehen wie stark die akute, serologische Antwort ist und inwieweit es in Seren von akut Infizierten zu Kreuzreaktivitäten kommt.

4.6 Evaluierung des anti-Rifttalieber-Virus IIFTs

RVFV ist ein *emerging virus*, eingeordnet als BSL-3-Erreger, und es wird befürchtet, dass sich das Virus sich im Zuge der weltweiten Tiertransporte und der Klimaerwärmung weiter

nach Norden ausbreitet [238,239]. Zur Diagnose von menschlichen Seren existieren derzeit, außer dem anti-RVSV IIFT, keine kommerziellen Teste. Dieser neu hergestellte IIFT sollte daher im Vergleich zu *in-house* Testen evaluiert werden.

Für die RVSV-Untersuchungen standen bisher insgesamt 30 IgG-ELISA-positive und nur 4 IgM-ELISA-positive Seren zur Verfügung. Die Evaluierungsdaten für IgM sollten daher als vorläufig betrachtet werden. Der anti-RVSV IgG-IIFT zeigt eine zum RVSV-ELISA vergleichbare Sensitivität, sowie eine verlässliche Spezifität.

Von den insgesamt 39 Seren, die im IgM-IIFT getestet wurden, waren neun Seren positiv. Bei der Testung dieser Seren mit dem anti-RVSV ELISA in Südafrika wurden jedoch nur noch vier Seren als IgM-positiv gefunden. Dies könnte u.U. auf die Lagerung der Serumproben während des Versands nach Südafrika zurückzuführen sein. IgM-Antikörper scheinen generell empfindlicher gegenüber einer unsachgemäßen Lagerung zu sein (siehe 3.1). Der Test sollte mit weiteren, IgM- und IgG-positiven Seren evaluiert werden, um eine endgültige Aussage über die Leistungsfähigkeit des Testes machen zu können.

4.7 Herstellung und Evaluierung rekombinanter, serologischer Teste

4.7.1 Herstellung und Evaluierung des anti-Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus IFTs und Austestung von weiteren Substraten

Es gibt eine Reihe von verschiedenen Methoden um anti-CCHFV Antikörper zu detektieren, wovon viele auf der Anzucht von lebendem, biologischen Material beruhen. Damit ist jedoch die Herstellung und Verwendung auf nur wenige, ausgewählte Labore begrenzt, die Zugang zu einem BSL-4-Labor haben [154,240,241,242]. Die, vor allem in den letzten Jahren publizierten, rekombinanten Methoden werden bis jetzt noch nicht kommerziell angeboten und stehen daher nur wenigen Laboren zur Verfügung [122,123,125,243]. Die endemische CCHFV-Situation in der Türkei hat einen Mangel an serologischen Diagnostikprodukten für das CCHFV aufgezeigt.

Da geeignete BSL4-Laboratorien nicht zur Verfügung standen, wurden die viralen Proteine N und G_N/G_C in rekombinanter Form verwendet. Die Proteine wurden ausgewählt, da sie die Hauptantigene des CCHFV darstellen. Das N-Protein ist genetisch relativ konserviert; die N-Proteine von CCHFV-Isolaten verschiedener genetischer Linien unterscheiden sich auf Aminosäureebene nur um 10 % [244]. Zudem induziert es nur begrenzt kreuzreaktive Antikörper, so reagieren Antikörpern gegen das Dugbe- und das Hazara-Virus z.B. nicht mit rekombinant im Baculovirussystem hergestelltem CCHFV N-Protein [122,125]. Die Glykoproteine an der Oberfläche des CCHFV vermitteln die Bindung des Virus an die zellulären Rezeptoren. Diese Bindung kann durch neutralisierende Antikörper verhindert werden, das heißt es besteht ein evolutionärer

Druck durch das Immunsystem auf die Glykoproteine. Diese zeigen daher eine größere genetische Variabilität als das N-Protein.

Für die Transfektion der CCHFV-Proteine N und GPC wurden HEK 293^{RKI}-Zellen verwendet. Bei den HEK 293^{RKI}-Zellen handelt es sich um eine Linie der HEK 293-Zellen (*Human Embryonic Kidney*), die mit dem T-Antigen des SV40 Virus transformiert wurden. Sie lassen sich generell sehr gut transfizieren und auch mit den CCHFV-Proteinen haben sie im Vergleich zu den anderen Zelllinien die beste Transfektionseffizienz gezeigt.

Da der Polio-Impfstoff (sowohl der inaktivierte Salk-, wie auch der lebende Sabin-Impfstoff) zwischen 1955 und 1963 auf SV40 infizierten primären Nierenzellen von Simian-Affen angezüchtet worden war, bestand anfangs die Vermutung, dass spezifische Reaktionen gegen das T-Antigen von SV40 in den 293T-Zellen eine IIFT-Bestimmung behindern könnten. In Europa, der Sowjetunion und den USA sind in dieser Zeit Millionen von Menschen geimpft worden [245,246]. Es konnten damals jedoch in verschiedenen Studien keine Antikörper gegen das T-Antigen des SV40 in der geimpften Bevölkerung nachgewiesen werden [247,248,249]. Es zeigte sich auch in unserer Untersuchung mit Blutspendenserum keine starke unspezifische Reaktion, die mit den exprimierten Glycoproteinen und dem N-Protein des CCHFV verwechselt werden könnte. Allerdings haben die Zellen im Gegensatz zu den Vero E6-Zellen eine vergleichsweise hohe, unspezifische Hintergrundreaktivität. Daher wurde der Sekundärantikörper mit Evan's Blue versetzt, wodurch unspezifisch die Zellen angefärbt werden und die spezifische Färbung besser zu erkennen ist.

Der anti-CCHFV IIFT wurde mit verschiedenen Serumpanseln aus verschiedenen geographischen Gebieten evaluiert. Die Sensitivitäten, vor allem auf IgM-Ebene unterschieden sich stark, von 44,4 % bis zu 93,3 %. Mögliche Gründe für diese Abweichungen könnten die verschiedenen, verwendeten Vergleichsteste sein. Selbst entwickelte *in-house* Teste wurden im Iran und in Südafrika verwendet (ELISA Nr. 2 und 4), während in den Laboren in Slowenien und in der Türkei der vom CDC bereitgestellte ELISA verwendet wurde (ELISA Nr. 1 und 3). Allerdings zeigten auch diese letzten Panels eine große Varianz der Sensitivitätswerte. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die verwendeten Teste nicht standardisiert sind und dementsprechend die Qualität schwanken kann. Zudem ist es möglich, dass durch die unterschiedliche Handhabung der Vergleichsteste als auch des IIFTs in den verschiedenen Laboren unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden. Während diverser Qualitätskontrollstudien, z.B. zur serologischen Diagnose von FSME oder WNV, die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, hat sich herausgestellt, dass zum Teil auch Laboratorien, die denselben Test verwendet haben, eine große Varianz in den Ergebnissen erzielten [250,251].

Da es sich um eine retrospektive Studie handelte und zum Teil bis zu einem Jahr zwischen der ELISA- und der IIFT-Testung lag, könnte es auch sein, dass die Antikörper über die Zeit geschädigt wurden und sich die unterschiedlichen Sensitivitäts-Werte darin begründen. Das würde auch erklären warum die Werte bei der IgM-Testung größere Unterschiede zeigten als bei der IgG-Analyse. Schon in der CHIKV-Studie zeigte sich, dass IgM empfindlicher gegenüber einer längeren Lagerung unter nicht idealen Bedingungen zu sein scheint (siehe 4.2). Einzig bei dem Panel aus der Türkei, das eine Sensitivität im IgM-IIFT von 93,3 % zeigte, ist bekannt wie die Proben gelagert wurden. Von jedem Serum wurden direkt nach der ELISA-Testung mehrere Aliquots bei -80 °C eingefroren und die IIFT-Testung wurde mit einem frischen Aliquot durchgeführt, ohne weitere Einfrier-Auftau-Zyklen oder eine Lagerung bei 4 °C.

Ein weiterer, möglicher Grund für die gemessenen Unterschiede in den Sensitivitäten könnten die unterschiedlichen genetischen Linien von CCHFV sein, die weltweit kursieren. Aufgrund der Genotypen lässt sich allerdings nur bedingt auf die unterschiedlichen Serotypen und demnach auf die Reaktionen im IIFT schließen. Die Stämme aus dem Kosovo gehören zum Genotyp 4, die südafrikanischen Stämme zum Genotyp 3, die Stämme aus dem Iran v.a. zum Genotyp 1 und in der Türkei kursieren Stämme vom Genotyp 4 und seit 2007 auch vom Genotyp 6. Die Seren des türkischen Panels stammten größtenteils aus dem Jahr 2009 und gehörten damit höchstwahrscheinlich zum Genotyp 6. Der Genotyp 6 ähnelt dem griechischen Stamm von 1975 und unterscheidet sich damit um ca. 20 - 25 % auf Nukleotidlevel von dem Genotyp 4-Cluster, das im Kosovo vorkommt. Der für den IIFT verwendete Stamm IbAr10200, der 1966 in Nigeria isoliert wurde, hingegen gehört zum Genotyp 3 [149,150].

Ausgedehntere Studien mit frischen Serumpanels sollten durchgeführt werden, und aufdecken, ob die unterschiedlichen Sensitivitäten auf der Lagerung der Seren, der geographischen Herkunft der Seren oder den unterschiedlichen Leistungen der *in-house* ELISAs beruhen.

Für einige Seren des CCHFV-Kollektivs 1 war der Erkrankungstag bei Serumentnahme bekannt. Anhand dieser Werte konnte der Verlauf der gemessenen IgM- und IgG-Antikörper bestimmt werden. Auch bei diesem Vergleich der IIFT- und ELISA-Ergebnisse wird zunächst deutlich, dass der ELISA Nr. 1 sensitiver ist. Dies könnte allerdings ebenfalls auf die oben genannten Gründe zurückzuführen sein.

Generell kann man feststellen, dass zunächst die IgM- und dann die IgG-Antikörper ansteigen. Von Tag 11 an ist mit dem ELISA in allen Seren IgM detektierbar. IgG ist ab Tag 21 in allen Seren per ELISA nachweisbar. Die Rate der positiv detektierten Seren im IgM-IIFT erreicht zwischen Tag 11 und 20 ihr Maximum und fällt danach wieder ab. Ab Tag 21 waren mit dem IgG-IIFT ebenfalls alle Seren positiv diagnostiziert. Aus diesen Daten kann

man auf die Bedeutung der IgM-Bestimmung in einer akuten Erkrankung schließen [144]. Da IgM (zumindest mit den untersuchten Testen) einige Tage vor IgG detektierbar ist und schon ab Tag 21 langsam wieder abfällt, ist IgM ein guter Marker einer akuten Infektion.

Die Bestimmung der Reaktivitäten der unterschiedlichen CCHFV-Proteine zeigte, dass es sinnvoll ist sowohl das N-, wie auch die Glykoproteine in einem Test anzubieten. Mit dem N-Protein waren in beiden IIFTs hohe Reaktivitäten zu detektieren. Sie lagen im IgM-IIFT insgesamt bei 94,1 % und im IgG-IIFT bei über 90,7 %. Die G_N - und G_C -Proteine zeigten im IgG-IIFT noch höhere Reaktivitäten von 99,2 %, allerdings wurden sie von den IgM-Antikörpern nur unzureichend erkannt. Die beste Reaktivität konnte im Panel 1 gemessen werden, mit 64,1 %. In den anderen Panels lag sie bei ca. 20 % bzw. im iranischen Panel wurde kein G_N/G_C -Protein detektiert.

Unter Umständen ist das Ausdruck der genetischen Unterschiede der Viren aufgrund der verschiedenen geographischen Gebiete. Die Unterschiede in der Erkennung der Proteine durch IgM und IgG könnten zudem möglicherweise dadurch erklärt werden, dass es eine gewisse sterische Hinderung gibt, so dass die großen IgM-Moleküle schlechter an die Proteine binden können.

Die Austestungen der für das Baculovirussystem produzierten Konstrukte, zeigte eine bessere Reaktivität des N-Proteins. Die einzige Veränderung gegenüber dem herkömmlichen Konstrukt war die Klonierung in einen neuen Vektor, in pTriEx-1. Die bessere Reaktivität und damit höhere Sensitivität, könnte dadurch erklärt werden, dass das pTriEx-1-Plasmid einen effektiveren Promotor besitzt als das ursprüngliche Plasmid. Die Verbesserung des Promotors der CCHFV-Plasmide kann die Rate der detektierbaren, Antigen-produzierenden Zellen um ein Vielfaches erhöhen (Éric Bergeron, persönliche Mitteilung).

Insgesamt stellt die Expression rekombinanter Antigene in eukaryotischen Zellen eine gute Alternative für die Herstellung von IIFT-Substraten dar, besonders für Viren oder andere Infektionserreger, die schlecht oder gar nicht in Zellkultursystemen wachsen, oder für Erreger der Sicherheitsstufe BSL4, mit denen nicht ohne weiteres IF-Substrate hergestellt werden können.

4.7.2 Herstellung und Evaluierung eines rekombinanten anti-Dengue-Virus NS1 Mosaik IIFTs

Die für die CCHFV-Substrate entwickelte Methode der Expression von rekombinanten Antigenen in eukaryotischen Zellen wurde ebenfalls für einen rekombinanten anti-DENV NS1 Mosaik IIFT genutzt.

Bis jetzt gibt es, außer dem konventionellen anti-DENV Mosaik IIFT der Firma EUROIMMUN keinen verbreiteten, kommerziell angebotenen serologischen DENV-Test, der alle vier DENV-Serotypen gleichzeitig anbietet und somit eine Serotypisierung überhaupt möglich macht (siehe Kap. 3.3.1 und 4.4). Die in dieser Arbeit vorgestellte Serotypisierung mit dem konventionellen anti-DENV Mosaik IIFT beruht allerdings vor allem auf der Bestimmung der Serotypen per IgM-IIFT. Dementsprechend konnten länger zurückliegende Infektionen nicht verlässlich serotypisiert werden. Außerdem konnte bei Primärinfektionen nur ca. jedes zweite Serum serotypisiert werden, bei Sekundärinfektionen waren es noch weniger. Das Ziel war die Entwicklung eines rekombinanten anti-DENV Mosaik IIFTs, mit dem eine verbesserte Serotypisierung möglich ist.

Als rekombiantes Substrat für den zu entwickelnden IIFT, wurden die NS1-Proteine ausgewählt. Diese bieten den Vorteil, dass sie weniger kreuzreaktiv sind als die E- und M-Proteine, die in großen Mengen auf DENV-infizierten Zellen nachgewiesen werden können [97]. NS1-Proteine kommen u.a. auf der Zelloberfläche als Homodimere vor und werden von den Zellen als lösliche Hexamere freigesetzt werden [79,80,81]. In der Literatur wurden ein IgM- und ein IgG-ELISA beschrieben, bei denen die sezernierten NS1-Proteine von DENV-infizierten Vero-Zellen verwendet wurden [110,117,228]. Diese ELISAs zeigten viel versprechende Resultate, haben jedoch den Nachteil, dass mit frischem, infizierten Überstand gearbeitet werden muss. Dementsprechend sind diese ELISAs bis dato nicht kommerziell erhältlich. Für den rekombinanten anti-DENV NS1 IIFT wird kein infektiöses Material verwendet und er beruht auf einer schon kommerzialisierten Plattform (anti-CCHFV IIFT).

Insgesamt zeigte dieser rekombinante anti-DENV NS1 Test sehr viel versprechende Ergebnisse. Betrachtet man die verschiedenen DENV NS1-Substrate einzeln, so fällt zunächst allerdings auf, dass insgesamt nur zwei Seren eine Reaktion (schwach-positiv) mit dem DENV-3 NS1-Substrat zeigten. Ursache für diese geringere Reaktivität könnte z.B. eine reduzierte Expressionsrate sein, was durch eine Austestung mit einem weiteren DEN-3 NS1-Konstrukt geklärt werden sollte. Die Inkubation beider Panels sollte dann mit einem neuen Test, beruhend auf vier gleich stark reaktiven NS1-Proteinen, wiederholt werden.

Wenn man aber nur die acht Seren betrachtet, die per PCR mit den Serotypen 1, 2 und 4 vorcharakterisiert worden waren, so konnten im Panel 1 z.B. 75 % (6/8) der Seren mit dem IgG-IIFT richtig serotypisiert werden. Die restlichen beiden Seren reagierten gleich intensiv mit einem weiteren Serotyp.

Weiterhin zeigte sich, dass die IgM-Bestimmung im Falle des rekombinanten anti-DENV NS1 Mosaik IIFTs (im Gegensatz zur Situation beim konventionellen anti-DENV Mosaik IIFT) nicht zur Serotypisierung geeignet war. Die Reaktion gegen DENV-2 überwog,

unabhängig vom eigentlichen Serotyp der Infektion. Warum das DENV-2-Substrat im IgM-IIFT solch eine starke Reaktivität zeigte, bzw. die Reaktion gegen die anderen Serotypen soviel geringer ausfiel, konnte nicht abschließend geklärt werden. Es wäre aber möglich, dass es sterische Gründe dafür gab, d.h. das DENV-2 NS1 in einer etwas anderen Form vorlag als die anderen NS1-Substrate und somit die größeren IgM-Pentamere besser binden konnten.

Prinzipiell geht man davon aus, dass bis zum Tag 9 freie NS1-Proteine im Blut nachweisbar sind und bei einer Primärinfektion erst im Anschluss, d.h. also ab dem neunten Tag Antikörper gegen das NS1-Protein detektiert werden können [107]. Bei einer Sekundärinfektion sollten laut Shu *et al.* 2003 [110] bis Tag 9 IgG-Antikörper gegen den Serotyp der Primärinfektion und danach IgG-Antikörper gegen den Serotyp der Sekundärinfektion nachweisbar sein.

Die Seren des Panels 1 waren 9 - 49 Tage nach Einsetzen der Symptome entnommen worden, während die Seren des Panels 2 schon 2 - 9 Tage nach Symptombeginn entnommen worden waren. Da das Panel 2 hauptsächlich aus Seren nach Sekundärinfektion bestand (siehe Kap. 4.4), war zu erwarten, dass in Panel 1 und Panel 2 (bis auf die Seren aus einer Primärinfektion) insgesamt eine ähnlich starke IgG-Antikörper-Reaktion detektiert werden würde. Es zeigte sich jedoch, dass sich die Reaktivitäten der beiden Panel stark unterschieden. Während im Panel 1 91,7 % (11/12) der Seren eine Reaktion mit zumindest einem der Serotypen zeigten, waren es im Panel 2 nur 43,8 % (7/16). Die Seren des Panels 2 hatten zudem einen geringeren Titer.

Eine mögliche Erklärung für den geringen anti-NS1 IgG-Titer bei den Sekundärinfektionen ist, dass schon ab dem 1. Tag nach Symptombeginn die NS1-Proteine in sehr hohen Konzentrationen frei im Blut vorliegen [107]. Es wäre möglich, dass die kreuzreaktiven Antikörper an die freien NS1-Proteine binden und im Serum daher nur noch geringere anti-NS1 Antikörper-Konzentration nachweisbar sind.

Wie schon erwähnt, sollten laut Shu *et al.* [110] bei einer Sekundärinfektion von Tag 1 bis Tag 8 IgG-Antikörper gegen den Serotyp der Primärinfektion und ab Tag 9 IgG-Antikörper gegen den Serotyp der Sekundärinfektion nachweisbar sein. Generell konnten im Panel 2 allerdings nur vier der sieben reaktiven Seren serotypisiert werden (Nr. 15, 19, 20, 24).

Betrachtet man diese Seren einzeln so zeigt sich, dass bei den Seren Nr. 19 und 20 der Serotyp bestimmt wurde, der auch per PCR detektiert worden war. Serum Nr. 20 stammte höchstwahrscheinlich von einer Primärinfektion und war 9 Tage nach Symptombeginn entnommen worden. Bei Serum Nr. 19 handelte es sich laut Aviditäts-ELISA um eine Sekundärinfektion. Da der ELISA allerdings nur eine Spezifität von 82 % hat [111], könnte dieses Serum unter Umständen falsch-positiv getestet worden sein. Dafür, dass es sich in

Wahrheit um eine Primärinfektion handelt, spricht, dass das Serum, das sechs Tage nach Einsetzen der Symptome entnommen worden ist, im ELISA nur eine OD unterhalb des *Cut-offs* und im herkömmlichen anti-DENV IgG-IIFT nur einen Titer von maximal 1:100 aufweist.

Bei Serum Nr. 15 und 24, deren Serotyp nicht mit der PCR-Bestimmung übereinstimmte, handelt es sich mit großer Sicherheit um Sekundärreaktionen. Beide Seren zeigen auch im Aviditäts-ELISA eine sehr hohe OD und einen hohen Aviditätsquotienten, sowie im herkömmlichen anti-DENV IIFT sehr hohe IgG-Titer (>1:10.000). Das Serum Nr. 15 stammte von einem Patienten von den Seychellen, bei dem per PCR DENV-1, im IIFT aber DENV-2 detektiert wurde. Eine DENV-2-Primärinfektion bei diesem Patienten ist möglich, da es auf den Seychellen in den Jahren 1976 – 1979 (und möglicherweise darüber hinaus) eine DENV-2 Epidemie gab [252]. Auch im konventionellen anti-DENV IgG-IIFT zeigte dieses Serum die stärkste Reaktion mit dem DENV-2 Serotyp.

Das Serum Nr. 24 stammte von einem Patienten aus Guadeloupe, bei dem per PCR DENV-2 und im IIFT DENV-1 detektiert worden war. Eine Primärinfektion mit dem per IIFT detektierten DENV-1 ist bei diesem Patienten ebenfalls möglich, da im Jahre 1996 - 1998 auf Guadeloupe eine DENV-1 Epidemie herrschte [253].

Eventuell wäre es mit einem reaktiven DENV-3 Substrat möglich gewesen, in den nicht reaktiven Seren des Panels 2, die aus Sekundärinfektionen stammten, weitere Serotypisierungen der Primärinfektionen zu erhalten.

Prinzipiell ist es für die Deutung des rekombinanten IIFTs wichtig, dass der Zeitpunkt des Einsetzens der Symptome bekannt ist und eine Unterscheidung zwischen Primär- und Sekundärinfektion gemacht wird. In diesem Fall wurde die Unterscheidung mit Hilfe eines Aviditäts-ELISAs gefällt. Grundsätzlich wäre jedoch auch eine Unterscheidung per Aviditäts-IIFT oder einer IgM/IgG-Ratio mit dem konventionellen anti-DENV IIFT möglich (siehe Kap. 4.4).

Im Allgemeinen gab es, nimmt man die DENV-3 vorcharakterisierten Seren aus der Betrachtung heraus, keine falsch serotypisierten Seren aus einer Primärinfektion. Die Seren nach Sekundärinfektion konnten ebenfalls serotypisiert werden, zeigten allerdings im IgG-IIFT nicht den aktuellen Serotyp, sondern höchstwahrscheinlich den aus der zuvor abgelaufenen Primärinfektion.

Mit dem rekombinanten anti-DENV NS1 Mosaik IIFT kann man mittels der IgG-Bestimmung serotypisieren und somit auch den Serotyp länger zurückliegender Infektionen bestimmen. So hat man den Vorteil, dass man in den ersten Tagen einer Sekundärinfektion den Serotyp der Primärinfektion bestimmen kann. Denn wenn ein Serum in den ersten Tagen der Infektion eine serotypspezifische anti-NS1 IgG-Antwort

zeigt, dann handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um den Serotyp der Primärinfektion. Dies ist z.B. für epidemiologische Fragestellungen wichtig.

Es können allerdings höchstwahrscheinlich nicht mehr als zwei Serotypen von aufeinander folgenden DENV-Infektionen unterschieden werden. Die Serotypen einer dritten oder gar vierten Infektion lassen sich mit diesem System wahrscheinlich nicht mehr differenzieren.

Insgesamt ist der vorgestellte anti-DENV NS1 IIFT der erste rekombinante IIFT, bei dem eine Serotypisierung mit Hilfe der NS1-Proteine erreicht wird. Ein Vorteil dieses IIFTs liegt darin, dass er, im Gegensatz zum arbeitsintensiven PRNT, schnell und von vielen Laboren durchgeführt werden kann und zwischen IgM- und IgG-Bestimmung unterscheiden kann. Außerdem bietet der IIFT unter Umständen, in den ersten Tagen einer Sekundärinfektion auch die Möglichkeit der Detektion des Serotyps der Primärinfektion.

Die Entwicklung des rekombinanten anti-DENV NS1 Mosaik IIFTs ist allerdings noch nicht abgeschlossen. Zunächst muss das DENV-3 NS1-Konstrukt nochmals hergestellt und die Inkubation der Panels 1 und 2 mit vier gleich stark reaktiven NS1-Proteinen wiederholt werden.

Außerdem sollten im Anschluss weitere, gut charakterisierte Serumpanels getestet werden, damit eine genauere Aussage über die Fähigkeit des rekombinanten IIFTs zur Serotypisierung getroffen werden kann. Am besten eignen sich dafür zunächst DENV-Serumpanels von Reisenden, da die Gefahr, dass sie mehr als einmal mit DENV infiziert worden sind, deutlich geringer ist.

Zusätzlich könnten aber auch Seren einer Sekundärinfektion untersucht werden, bei denen der Serotyp der Primär- und Sekundärinfektion bekannt ist, um zu evaluieren inwieweit eine Unterscheidung der Serotypen der Primär- und Sekundärinfektion mittels der Serologie möglich ist. Dabei sollte genau untersucht werden, bis wann die anti-NS1 IgG-Antikörper der Primärinfektion im Blut bei einer Sekundärinfektion nachgewiesen werden können.

Eine weitere interessante Möglichkeit wäre außerdem die NS1-Proteine in einem ELISA-Format anzubieten. Durch das gewählte Expressionssystem besteht die Möglichkeit die DENV NS1-Proteine rekombinant auch im Baculovirussystem herzustellen. Man könnte somit testen, ob auch im ELISA-Format eine Serotypisierung möglich ist und ob sich die Sensitivität des IgM-Nachweises möglicherweise verbessern lässt.

4.8 Abschließende Betrachtung

Die Evaluierungen der verschiedenen IIFTs zeigten, dass diese vergleichbare Ergebnisse mit den entsprechenden *in-house* bzw. kommerziellen Testen liefern. Mit diesem Wissen, können die Laboratorien auf einen evaluierten, kommerziellen IIFT zur Diagnose von

tropischen, arboviralen Erkrankungen zurückgreifen und die Ergebnisse, die sie erhalten entsprechend einordnen. Der IIFT stellt entweder, wie z.B. für JEV oder DENV eine gute Alternative zu den vorhandenen, kommerziellen, diagnostischen Möglichkeiten dar, oder ist, wie z.B. bei CCHFV der erste kommerziell erhältliche und CE-zertifizierte Test überhaupt.

Der Einsatz von rekombinanten IIFTs bietet vielfältige Einsatzmöglichkeiten und Vorteile, so wird z.B. die Herstellung von IIFTs zur serologischen Diagnose von BSL-4 Erregern deutlich vereinfacht. Außerdem können die detektierten Kreuzreaktivitäten reduziert werden, wodurch sich neue Einsatzfelder, wie z.B. eine verbesserte DENV-Serotypisierung mittels der anti-NS1 Antikörper ergeben können.

Allerdings sind im Vergleich zum Einsatz von Virus-Vollantigenen auch einige Nachteile der rekombinanten Substrate zu bedenken. So konnte man z.B. besonders bei dem anti-TOSV ELISA der Firma DIESSE eindeutig eine geringere Sensitivität im Vergleich zum anti-SFV IIFT und speziell zum TOSV-Substrat des IIFTs feststellen. Der ELISA beruhte auf dem rekombinanten Nukleoprotein des TOSV, während beim IIFT virusinfizierte Zellen verwendet wurden. Da man bei rekombinanten Testen nur die Antikörper gegen ein bestimmtes Protein oder Antigen nachweist und diese in der Regel eine geringere Konzentration haben als die Summe der Antikörper gegen alle virusspezifischen Proteine, ist in einigen Fällen eine geringere Sensitivität die Folge. Unter Umständen ist es daher angebracht zunächst einen sensitiveren Suchtest mit Virus-Vollantigenen einzusetzen und danach mit einem spezifischeren, rekombinanten Test gegebenenfalls eine Bestätigung bzw. eine genauere Charakterisierung durchzuführen. Dies muss jedoch für jedes ausgewählte Protein und Antigen separat evaluiert werden, da sich die immunologischen Reaktionen und Antikörperkonzentrationen für jedes Antigen stark unterscheiden können. Die Reaktivität der IgM- und IgG-Antikörper mit den ausgewählten Antigenen kann sich im IIFT unterscheiden, möglicherweise durch die Präsentation in und auf den Zellen.

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden wertvolle Erfahrungen für die Auswahl der verschiedenen Antigene gewonnen, die für weitere Entwicklungen genutzt werden können. Insgesamt bieten die rekombinanten Teste, wenn sie mit großer Sorgfalt evaluiert werden, ein großes diagnostisches Potential.

5 Zusammenfassung

Für viele tropische Infektionserreger herrscht ein Mangel an guten, kommerziell hergestellten, serologischen Testen. Meist beruht die serologische Diagnostik für arbovirale Erreger auf *in-house* Testen und ist nur in wenigen Laboren verfügbar. Eine schnelle Diagnostik ist jedoch unerlässlich, um z.B. eine eingeschleppte, tropische Krankheit erkennen und im Notfall die nötigen Gegenmaßnahmen treffen zu können.

Um einer größeren Zahl von Laboratorien qualitätsgesicherte, serologische Nachweissysteme zur Verfügung zu stellen, wurden im Rahmen der Promotionsarbeit umfangreiche Testevaluierungen für die fünf folgenden, mit Virus-Vollantigen hergestellten Immunfluoreszenzteste (IIFTs) durchgeführt und die Ergebnisse ausgewertet: anti-Chikungunya-Virus (CHIKV), anti-Japanisches Enzephalitis-Virus (JEV), anti-Dengue-Virus (DENV), anti-Sandfliegen-Fieber-Viren (SFV) und anti-Rifttalfeiber-Virus (RVFV) IIFT. Zudem wurden zwei rekombinante Testsysteme, für das Krim-Kongo Hämorrhagisches Fieber-Virus (CCHFV) und das DENV entwickelt und beide Tests ebenfalls in einer Studie mit charakterisierten Serumpanseln evaluiert.

Der anti-CHIKV IIFT wurde im Vergleich zu zwei *in-house* Testen evaluiert. Er zeigte für IgM eine Sensitivität von 96,9 %, sowie eine Spezifität von 98,3 %. Für den IgG-IIFT wurde eine Sensitivität von 95,4 % und eine Spezifität von 100 % berechnet.

Die Evaluierung des anti-JEV IIFTs wurde im Vergleich zu zwei kommerziellen ELISAs und einem Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT) durchgeführt. Der IgM-IIFT zeigte im Vergleich zum Panbio IgM-ELISA eine Sensitivität von 86 % und eine Spezifität von 95 %. Im Vergleich zum InBios IgM-ELISA wurde für den IgM-IIFT eine Sensitivität von 83,9 % und eine Spezifität von 100 % ermittelt. Der IgG-IIFTs zeigte im Vergleich zum PRNT eine Sensitivität von 93,8 % und eine Spezifität von 100 %.

Der anti-DENV IIFT wurde hinsichtlich der Fähigkeit untersucht, den per PCR bestimmten Serotyp der Infektion serologisch zu identifizieren. Mittels des IgM-IIFTs, konnten 52 % der IgM-reaktiven Seren mit dem anti-DENV IIFT richtig serotypisiert werden. Bei weiteren 48 % der Seren zeigten mehrere Serotypen eine gleich starke Fluoreszenz. Bei 92 % dieser Seren war jedoch der per PCR bestimmte, unter den am stärksten reaktiven Serotypen.

Der anti-SFV-IIFT wurde mit zwei kommerziell erhältlichen Testen, einem anti-Toscana-Virus (TOSV) ELISA und einem anti-TOSV Blot, verglichen. Die stärkste Reaktivität im ELISA und Blot konnte in den 25 Seren gefunden werden, die im IIFT sowohl mit dem SFV Naples- als auch mit dem TOSV-Substrat reagiert hatten. Während im ELISA 28 % der Seren als positiv detektiert wurden, waren 98 % der Seren im Blot positiv. In den 46 Seren, die im IIFT ausschließlich mit dem TOSV-Substrat reagiert hatten, wurden mit dem ELISA 10,9 % als grenzwertig und mit dem Blot 30 % als positiv identifiziert. Der IIFT zeigte

insgesamt eine höhere Sensitivität als der Blot, und eine viel höhere Sensitivität als der ELISA.

Der anti-RVFPV IIFT wurde im Vergleich zu einem *in-house* ELISA evaluiert. Die Spezifität des IgM-IIFTs lag bei 99,4 %, die Sensitivität konnte aufgrund der zu geringen Probenanzahl nicht ermittelt werden. Der IgG-IIFT zeigte eine Sensitivität von 93,3 % und eine Spezifität von 99,5 %.

Es wurde ein rekombinanter anti-CCHFV IIFT entwickelt. Dafür wurde zunächst die Transfektion und Expression des Nukleoproteins und der Glykoproteine in HEK 293^{RKI}-Zellen optimiert. Der anti-CCHFV IIFT wurde im Anschluss mit vier verschiedenen Serumpanels, die in verschiedenen *in-house* ELISAs als anti-CCHFV-positiv vorcharakterisiert worden waren, und einem Panel von Blutspenderseren analysiert. Die Ergebnisse dieser Serumpanels, v.a. für den IgM-IIFT, unterschieden sich stark. Die Sensitivitäten für den IgM-IIFT lagen bei 54,3 %, 44,4 %, 93,3 %, sowie 92,9 % und die Spezifität bei 97,8 %. Für den IgG-IIFT lagen die Sensitivitäten bei 83,3 %, 100 %, 100 % und 69,2 % und die Spezifität bei 100 %.

Für den rekombinanten anti-DENV Test wurden die vier NS1-Proteine ebenfalls jeweils in HEK 293^{RKI}-Zellen exprimiert. Eine korrekte Serotypisierung war mit dem IgG-IIFT im Panel 1 bei 54,5 % der IgG-reaktiven Seren und im Panel 2, das hauptsächlich aus Seren nach Sekundärinfektion bestand, bei 28,6 % der IgG-reaktiven Seren möglich. Werden im Panel 1 nur die Seren mit den reaktiven DENV-Serotypen 1, 2 und 4 betrachtet, so konnten 75 % im IgG-IIFT richtig serotypisiert werden.

Insgesamt zeigten die verschiedenen IIFTs im Vergleich zu den verwendeten *in-house* bzw. kommerziellen Testen, vergleichbare Ergebnisse und können in den Laboratorien als evaluierte Alternativen zur Diagnose von tropischen, arboviralen Erkrankungen eingesetzt werden. Der IIFT stellt eine schnelle und effiziente Testplattform dar, mit der man vor allem Einzelseren, für die eine Untersuchung im ELISA zu aufwendig ist, analysieren kann.

Die Entwicklung rekombinanter IIFTs bietet zudem eine interessante Möglichkeit serologische Tests für Erreger der biologischen Sicherheitsstufe 4 (BSL-4) ohne größere Hindernisse herzustellen, und so auch für höher pathogene Erreger kommerzielle, serologische Diagnostika vielen Laboren zugänglich zu machen. Weiterhin lassen sich durch die Auswahl wenig kreuzreaktiver Proteine bzw. spezifischer Proteinbereiche in rekombinanten Testsystemen störende Kreuzreaktivitäten reduzieren. Insgesamt stellen rekombinant hergestellte Virusantigen-Substrate eine vielversprechende Alternative für die Herstellung von IIFT-BIOCHIPS dar.

6 Summary

There is a lack of good and commercially available serological assays for many tropical infectious agents. The serological diagnosis of arboviruses relies mainly on in-house assays and is available only in few laboratories. Yet, a rapid diagnosis is crucial to identify a newly introduced tropical infection and to take the adequate counter measures.

In order to provide an increased number of laboratories with quality assured, serological assays, extensive evaluations were performed for the following five indirect immunofluorescence tests (IIFTs) which are all produced with complete virus: anti-Chikungunya virus (CHIKV), anti-Japanese encephalitis virus (JEV), anti-Dengue virus (DENV), anti-Sandfly fever-virus (SFV) und anti-Rift valley fever virus (RVFV) IIFT. Additionally two recombinant test systems for the Crimean Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) and DENV were developed and both assays were likewise evaluated with characterised serum panels.

The anti-CHIKV IIFT was evaluated in comparison to two in-house assays. It revealed for IgM a sensitivity of 96.9 % and 98.3 %. For the IgG IIFT the sensitivity was 95.4 % and the specificity 100 %.

The evaluation of the anti-JEV IIFT was performed with two commercial ELISAs and a plaque reduction neutralization assay (PRNT). Compared to the Panbio IgM ELISA, the IgM IIFT showed a sensitivity of 86 % and a specificity of 95 %. In comparison to the InBios IgM ELISA the sensitivity was 83.9 % and the specificity 100 %. The IgG IIFT was evaluated against the PRNT and demonstrated a sensitivity of 93.8 % and a specificity of 100 %.

The anti-DENV IIFT was analysed in respect to its capability to identify serologically the correct DENV serotype that was determined by PCR beforehand. Using the IgM IIFT, 52 % of the sera containing IgM antibodies were correctly serotyped by the anti-DENV IIFT. In further 48 % of the sera an equal fluorescence was detected, and in 92 % of these sera, the serotype determined by PCR was one of the most reactive serotypes.

The anti-SFV IIFT was compared to two commercial assays, an anti-Toscana Virus (TOSV) ELISA and an anti-TOSV blot. The highest reactivity was found in the 25 sera, which reacted in the IIFT with the SFV Naples- and with the TOSV substrate. While 28 % of the sera were detected as positive by ELISA, 98 % were positive on the blot. Of the 46 sera, reactive only with the TOSV IIFT substrate, 10.9 % were equivocal in ELISA and 30 % positive with the blot. Altogether, the IIFT showed a higher sensitivity compared to the blot and a much higher sensitivity than the ELISA.

The anti-RVFPV IIFT was evaluated in comparison to an in-house ELISA. The specificity of the IgM IIFT was 99.4 %, while it was not possible to determine a sensitivity value, due to

an insufficient number of samples. The IgG IIFT showed a sensitivity of 93.3 % and a specificity of 99.5 %.

A recombinant anti-CCHFV IIFT was developed. For this, the transfection and expression of the nucleo- and the glycoproteins was optimised in HEK 293^{RKI} cells. Subsequently, the anti-CCHFV IIFT was evaluated with four different sera panels, characterised as anti-CCHFV positive with different in-house ELISAs. The results varied strongly, especially for IgM. The sensitivities for the IgM IIFT were 54.3 %, 44.4 %, 93.3 % and 92.9 %, while the specificity was 97.8 %. For the IgG IIFT the sensitivities were 83.3 %, 100 %, 100 % and 69.2 %, the specificity was 100 %.

For the recombinant anti-DENV assay the four NS1 proteins were likewise expressed in HEK 293^{RKI} cells. In Panel 1 it was possible with the IgG IIFT to correctly serotype 54.5 % of the sera reactive with IgG. In Panel 2, which consisted mainly of sera with secondary DENV infections 28.6 % of the IgG-reactive sera were serotyped correctly. Considering only the reactive DENV serotypes 1, 2 and 4, it was possible to serotype 75 % of the sera correctly.

Altogether, the different EUROIMMUN IIFTs showed comparable results to in-house and commercial assays and can be used as an extensively evaluated alternative for the diagnosis of tropical, arboviral diseases. The IIFT represents a rapid and efficient platform, especially for the diagnosis of single sera for which the analysis in ELISA is too laborious and cumbersome.

The development of recombinant IIFTs provides the opportunity to produce commercial serological assays for biosafety level 4 (BSL-4) agents without need of a high risk containment facility. Thereby, these products for the diagnosis of highly pathogenic viruses become available for many laboratories. Furthermore, it is possible to select less cross reactive proteins or specific regions of proteins for the production of recombinant assays. The reduced cross reactivity allows to distinctively diagnose even highly related viruses. Altogether, recombinantly produced viral antigens represent a promising alternative for the production of IIFT-BIOCHIPS.

7 Referenzen

1. Meyer CG, May J, Schwarz TF (1999) [Tropical viral diseases]. *Dtsch Med Wochenschr* 124: 1043-1051.
2. Gubler DJ (2002) The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 33: 330-342.
3. Weaver SC, Vasilakis N (2009) Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol* 9: 523-540.
4. Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D (2009) *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* 11: 1177-1185.
5. WHO, TDR (2009) *Dengue - Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. Geneva, Switzerland.
6. Tatem AJ, Hay SI, Rogers DJ (2006) Global traffic and disease vector dispersal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6242-6247.
7. Zachcial M, Heideloff C (2003) *ISL Shipping Statistics Yearbook 2003*. Bremen: Institute of Shipping Economics and Logistics.
8. Hawley WA, Reiter P, Copeland RS, Pumpuni CB, Craig GB, Jr. (1987) *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. *Science* 236: 1114-1116.
9. Reiter P, Sprenger D (1987) The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 3: 494-501.
10. Hofhuis A, Reimerink J, Reusken C, Scholte EJ, Boer A, et al. (2009) The hidden passenger of lucky bamboo: do imported *Aedes albopictus* mosquitoes cause dengue virus transmission in the Netherlands? *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 217-220.
11. Gould EA, Higgs S (2009) Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 109-121.
12. Hemmer CJ, Frimmel S, Kinzelbach R, Gurtler L, Reisinger EC (2007) [Global warming: trailblazer for tropical infections in Germany?]. *Dtsch Med Wochenschr* 132: 2583-2589.
13. Hubalek Z (2008) Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* 103 Suppl 1: S29-43.
14. Arguin PM, Marano N, Freedman DO (2009) Globally mobile populations and the spread of emerging pathogens. *Emerg Infect Dis* 15: 1713-1714.
15. Upham P, Thomas C, Gillingwater D, Raper D (2003) Environmental capacity and airport operations: current issues and future prospects. *J Air Transport Manage* 9: 145-151.
16. de la Fuente Layos L (2009) Air passenger transport in Europe in 2007. *EUROSTAT Statistics in focus*.
17. Tatem AJ, Rogers DJ, Hay SI (2006) Global transport networks and infectious disease spread. *Adv Parasitol* 62: 293-343.
18. Slingenbergh JI, Gilbert M, de Balogh KI, Wint W (2004) Ecological sources of zoonotic diseases. *Rev Sci Tech* 23: 467-484.
19. Gubler DJ (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.
20. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S (2007) A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* 3: e201.
21. de Lamballerie X, Leroy E, Charrel RN, Tsetsarkin K, Higgs S, et al. (2008) Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virol J* 5: 33.
22. Geisbert TW, Jahrling PB (2004) Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med* 10: S110-121.
23. Meyer CG (2007) *Tropenmedizin - Infektionskrankheiten*: Ecomed Verlag.

24. Zuckerman AJ, Banatvala JE, Griffiths P, Schoub B, Mortimer P (2009) Principles and Practice of Clinical Virology: John Wiley & Sons.
25. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE (2006) Fields Virology: Lippincott Williams & Wilkins.
26. Georgi P, Bierbach E (2006) Infektionskrankheiten und Infektionsschutzgesetz: Allgemeine und spezielle Infektiologie. München: Elsevier.
27. Abbas AK, Lichtman AH (2003) Cellular and Molecular Immunology: Elsevier.
28. Eisen HN, Siskind GW (1964) Variations in Affinities of Antibodies During the Immune Response. *Biochemistry* 3: 996-1008.
29. Stöcker W, Rateike M, Morrin M (2005) Verfahren zur Herstellung Festphasengebundener Bioreagenzien. PCT/EP2005/073693 - EP1718948 21.12.2006.
30. European Parliament and the Council (1998) Directive 98/79/EC of the European Parliament and the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. L 331/1. 07/12/1998. Official Journal of the European Commission.
31. International Organization for Standardization (2005) General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO 17025:2005.
32. International Organization for Standardization (2007) Medical laboratories - Particular requirements for quality and competence, ISO/DIS 15189:2007.
33. Bremond J, Plebani M (2001) IVD industry role for quality and accreditation in medical laboratories. *Clin Chim Acta* 309: 167-171.
34. Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI, Greenland P (1981) Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. *Ann Intern Med* 94: 557-592.
35. Strauss JH, Strauss EG (1994) The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 58: 491-562.
36. Parola P, de Lamballerie X, Jourdan J, Rovey C, Vaillant V, et al. (2006) Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerg Infect Dis* 12: 1493-1499.
37. Her Z, Kam YW, Lin RT, Ng LF (2009) Chikungunya: a bending reality. *Microbes Infect* 11: 1165-1176.
38. Powers AM, Logue CH (2007) Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol* 88: 2363-2377.
39. Economopoulou A, Dominguez M, Helyncck B, Sissoko D, Wichmann O, et al. (2009) Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol Infect* 137: 534-541.
40. Renault P, Josseran L, Pierre V (2008) Chikungunya-related fatality rates, Mauritius, India, and Reunion Island. *Emerg Infect Dis* 14: 1327.
41. Mavalankar D, Shastri P, Bandyopadhyay T, Parmar J, Ramani KV (2008) Increased mortality rate associated with chikungunya epidemic, Ahmedabad, India. *Emerg Infect Dis* 14: 412-415.
42. Bonn D (2006) How did chikungunya reach the Indian Ocean? *Lancet Infect Dis* 6: 543.
43. Charrel RN, de Lamballerie X, Raoult D (2007) Chikungunya outbreaks—the globalization of vectorborne diseases. *N Engl J Med* 356: 769-771.
44. Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguiberry S, Strobel M (2007) Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis* 7: 319-327.
45. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, et al. (2006) Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med* 3: e263.
46. Yergolkar PN, Tandale BV, Arankalle VA, Sathe PS, Sudeep AB, et al. (2006) Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerg Infect Dis* 12: 1580-1583.
47. Arankalle VA, Shrivastava S, Cherian S, Gunjekar RS, Walimbe AM, et al. (2007) Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. *J Gen Virol* 88: 1967-1976.

48. Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, Po C, Petropulacos K, et al. (2007) Chikungunya in north-eastern Italy: a summing up of the outbreak. *Euro Surveill* 12: E071122 071122.
49. Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, et al. (2008) Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg Infect Dis* 14: 852-854.
50. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, et al. (2007) Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370: 1840-1846.
51. Institut de Veille Sanitaire (2010) Cas autochtones d'infection à chikungunya dans le Var. 27 September 2010. [In French]. pp. Accessed 18 October 2010. Available at: http://www.invs.sante.fr/display/?doc=presse/2010/le_point_sur/point_chik_270910/index.htm.
52. Santhosh SR, Dash PK, Parida MM, Khan M, Tiwari M, et al. (2008) Comparative full genome analysis revealed E1: A226V shift in 2007 Indian Chikungunya virus isolates. *Virus Res* 135: 36-41.
53. Kumar NP, Joseph R, Kamaraj T, Jambulingam P (2008) A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. *J Gen Virol* 89: 1945-1948.
54. Lewthwaite P, Vasanthapuram R, Osborne JC, Begum A, Plank JL, et al. (2009) Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India. *Emerg Infect Dis* 15: 329-331.
55. WHO (2007) Chikungunya Fever - Information Sheet. pp. Accessed 20. December 2009. Available at: <http://www.searo.who.int/en/Section2010/Section2246.htm>.
56. Taubitz W, Cramer JP, Kapaun A, Pfeffer M, Drosten C, et al. (2007) Chikungunya fever in travelers: clinical presentation and course. *Clin Infect Dis* 45: e1-4.
57. Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C (2008) Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis* 14: 416-422.
58. Grivard P, Le Roux K, Laurent P, Fianu A, Perrau J, et al. (2007) Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. *Pathol Biol (Paris)* 55: 490-494.
59. Depoortere E, Coulombier D (2006) Chikungunya risk assessment for Europe: recommendations for action. *Euro Surveill* 11: E060511 060512.
60. CDC (2006) Chikungunya fever diagnosed among international travelers—United States, 2005-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 55: 1040-1042.
61. Endy TP, Nisalak A (2002) Japanese encephalitis virus: ecology and epidemiology. *Curr Top Microbiol Immunol* 267: 11-48.
62. WHO (1998) Japanese encephalitis vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 73: 337-344.
63. WHO (2006) Japanese encephalitis vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 81: 331-340.
64. Bharati K, Vratsi S (2006) Japanese encephalitis: development of new candidate vaccines. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4: 313-324.
65. Solomon T, Dung NM, Kneen R, Gainsborough M, Vaughn DW, et al. (2000) Japanese encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68: 405-415.
66. Ooi MH, Lewthwaite P, Lai BF, Mohan A, Clear D, et al. (2008) The epidemiology, clinical features, and long-term prognosis of Japanese encephalitis in central sarawak, malaysia, 1997-2005. *Clin Infect Dis* 47: 458-468.
67. Oya A, Kurane I (2007) Japanese encephalitis for a reference to international travelers. *J Travel Med* 14: 259-268.
68. Solomon T (2006) Control of Japanese encephalitis—within our grasp? *N Engl J Med* 355: 869-871.
69. Gould EA, Solomon T, Mackenzie JS (2008) Does antiviral therapy have a role in the control of Japanese encephalitis? *Antiviral Res* 78: 140-149.
70. Solomon T, Thao TT, Lewthwaite P, Ooi MH, Kneen R, et al. (2008) A cohort study to assess the new WHO Japanese encephalitis surveillance standards. *Bull World Health Organ* 86: 178-186.
71. Beasley DW, Lewthwaite P, Solomon T (2008) Current use and development of vaccines for Japanese encephalitis. *Expert Opin Biol Ther* 8: 95-106.

72. Schuller E, Jilma B, Voicu V, Golor G, Kollaritsch H, et al. (2008) Long-term immunogenicity of the new Vero cell-derived, inactivated Japanese encephalitis virus vaccine IC51 Six and 12 month results of a multicenter follow-up phase 3 study. *Vaccine* 26: 4382-4386.
73. Tauber E, Dewasthaly S (2008) Japanese encephalitis vaccines—needs, flaws and achievements. *Biol Chem* 389: 547-550.
74. Shlim DR, Solomon T (2002) Japanese encephalitis vaccine for travelers: exploring the limits of risk. *Clin Infect Dis* 35: 183-188.
75. CDC (2005) Japanese encephalitis in a U.S. traveler returning from Thailand, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 54: 123-125.
76. Lehtinen VA, Huhtamo E, Siikamaki H, Vapalahti O (2008) Japanese encephalitis in a Finnish traveler on a two-week holiday in Thailand. *J Clin Virol* 43: 93-95.
77. Ostlund MR, Kan B, Karlsson M, Vene S (2004) Japanese encephalitis in a Swedish tourist after travelling to Java and Bali. *Scand J Infect Dis* 36: 512-513.
78. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, et al. (1989) Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 70 (Pt 1): 37-43.
79. Noisakran S, Dechtawewat T, Avirutnan P, Kinoshita T, Siripanyaphinyo U, et al. (2008) Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts. *J Gen Virol* 89: 2492-2500.
80. Alcon-LePoder S, Sivard P, Drouet MT, Talarmin A, Rice C, et al. (2006) Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis. *Novartis Found Symp* 277: 233-247; discussion 247-253.
81. Jacobs MG, Robinson PJ, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR (2000) Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *Faseb J* 14: 1603-1610.
82. Gubler DJ (2006) Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp* 277: 3-16; discussion 16-22, 71-13, 251-253.
83. Halstead SB (2007) Dengue. *Lancet* 370: 1644-1652.
84. Thai KT, Binh TO, Giao PT, Phuong HL, Hung le O, et al. (2005) Seroprevalence of dengue antibodies, annual incidence and risk factors among children in southern Vietnam. *Trop Med Int Health* 10: 379-386.
85. Weaver SC, Reisen WK (2010) Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85: 328-345.
86. Kurane I, Ennis FE (1992) Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol* 4: 121-127.
87. Sabin AB (1952) Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1: 30-50.
88. Halstead SB (1974) Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg* 23: 974-982.
89. Tesh RB, Travassos da Rosa AP, Guzman H, Araujo TP, Xiao SY (2002) Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerg Infect Dis* 8: 245-251.
90. Jelinek T (2009) Trends in the epidemiology of dengue fever and their relevance for importation to Europe. *Euro Surveill* 14.
91. WHO (2009) Dengue and dengue haemorrhagic fever. Factsheet No 117. Revised March 2009. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
92. WHO (1997) Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, Switzerland: WHO.
93. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, et al. (1998) Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 352: 971-977.
94. Halstead SB (2002) Dengue. *Curr Opin Infect Dis* 15: 471-476.
95. Halstead SB (1970) Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med* 42: 350-362.
96. Halstead SB (1988) Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239: 476-481.

97. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirirakul N, Fitton P, Vasanaawathana S, et al. (2010) Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328: 745-748.
98. Meltzer E, Schwartz E (2009) A travel medicine view of dengue and dengue hemorrhagic fever. *Travel Med Infect Dis* 7: 278-283.
99. Bielefeldt-Ohmann H, Meyer M, Fitzpatrick DR, Mackenzie JS (2001) Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Res* 73: 81-89.
100. Rico-Hesse R (2003) Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 59: 315-341.
101. Barnes WJ, Rosen L (1974) Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg* 23: 495-506.
102. Gubler DJ, Reed D, Rosen L, Hitchcock JR, Jr. (1978) Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am J Trop Med Hyg* 27: 581-589.
103. Rosen L (1977) The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 26: 337-343.
104. Bravo JR, Guzman MG, Kouri GP (1987) Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 816-820.
105. Kalayanarooj S, Nimmannitya S (2005) Is dengue severity related to nutritional status? *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36: 378-384.
106. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR (1987) Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 821-823.
107. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, et al. (2002) Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol* 40: 376-381.
108. Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang YD, et al. (2006) Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J Clin Microbiol* 44: 2872-2878.
109. Chanama S, Anantapreecha S, A An, Sa-gnasang A, Kurane I, et al. (2004) Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *J Clin Virol* 31: 185-189.
110. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, et al. (2003) Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 622-630.
111. Domingo C, de Ory F, Sanz JC, Reyes N, Gascon J, et al. (2009) Molecular and serologic markers of acute dengue infection in naive and flavivirus-vaccinated travelers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65: 42-48.
112. Kuno G, Gomez I, Gubler DJ (1991) An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods* 33: 101-113.
113. Shu PY, Huang JH (2004) Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 642-650.
114. Brinton MA, Kurane I, Mathew A, Zeng L, Shi PY, et al. (1998) Immune mediated and inherited defences against flaviviruses. *Clin Diagn Virol* 10: 129-139.
115. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, et al. (2000) Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 62: 224-232.
116. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, et al. (2001) Antibody to the nonstructural protein NS1 of Japanese encephalitis virus: potential application of mAb-based indirect ELISA to differentiate infection from vaccination. *Vaccine* 19: 1753-1763.

117. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, et al. (2002) Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue virus infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test. *J Clin Microbiol* 40: 1840-1844.
118. Flick R, Whitehouse CA (2005) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Curr Mol Med* 5: 753-760.
119. Schmaljohn CS, Nichol ST (2006) Bunyaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. *Fields Virology*. 5th ed: Lippincott Williams & Wilkins.
120. Blackburn NK, Besselaar TG, Shepherd AJ, Swanepoel R (1987) Preparation and use of monoclonal antibodies for identifying Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Am J Trop Med Hyg* 37: 392-397.
121. Nichol S (2001) Bunyaviruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp. 1603–1633.
122. Marriott AC, Polyzoni T, Antoniadis A, Nuttall PA (1994) Detection of human antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus using expressed viral nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 75 (Pt 9): 2157-2161.
123. Saijo M, Qing T, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, et al. (2002) Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol* 40: 372-375.
124. Saijo M, Qing T, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, et al. (2002) Recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol* 40: 1587-1591.
125. Garcia S, Chinikar S, Coudrier D, Billecocq A, Hooshmand B, et al. (2006) Evaluation of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus recombinant antigen expressed by Semliki Forest suicide virus for IgM and IgG antibody detection in human and animal sera collected in Iran. *J Clin Virol* 35: 154-159.
126. Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol ST (2002) Characterization of the glycoproteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol* 76: 7263-7275.
127. Vincent MJ, Sanchez AJ, Erickson BR, Basak A, Chretien M, et al. (2003) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1. *J Virol* 77: 8640-8649.
128. Sanchez AJ, Vincent MJ, Erickson BR, Nichol ST (2006) Crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoprotein precursor is cleaved by Furin-like and SKI-1 proteases to generate a novel 38-kilodalton glycoprotein. *J Virol* 80: 514-525.
129. Ahmed AA, McFalls JM, Hoffmann C, Filone CM, Stewart SM, et al. (2005) Presence of broadly reactive and group-specific neutralizing epitopes on newly described isolates of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol* 86: 3327-3336.
130. Ergonul O, Whitehouse CA (2007) In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever – A Global Perspective*: Springer. pp. 328.
131. Whitehouse CA (2004) Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 64: 145-160.
132. Turell MJ (2007) Role of Ticks in the Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever – A Global Perspective*: Springer. pp. 328.
133. Hasle G, Bjune GA, Edvardsen E, Jakobsen C, Linnehol BA, et al. (2009) Transport of ticks by migratory passerine birds to Norway. *J Parasitol*: 1.
134. Gray JS, Dautel H, Estrada-Pena A, Kahl O, Lindgren E (2009) Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009: 593232.
135. Purnak T, Selvi NA, Altundag K (2007) Global warming may increase the incidence and geographic range of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Med Hypotheses* 68: 924-925.

136. Kampen H, Poltz W, Hartelt K, Wolfel R, Faulde M (2007) Detection of a questing *Hyalomma marginatum marginatum* adult female (Acari, Ixodidae) in southern Germany. *Exp Appl Acarol* 43: 227-231.
137. Nalca A, Whitehouse CA (2007) Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Infection among Animals. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever – A Global Perspective*: Springer. pp. 328.
138. Hoogstraal H (1979) The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol* 15: 307-417.
139. Zeller HG, Cornet JP, Camicas JL (1994) Experimental transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by west African wild ground-feeding birds to *Hyalomma marginatum rufipes* ticks. *Am J Trop Med Hyg* 50: 676-681.
140. Logan TM, Linthicum KJ, Bailey CL, Watts DM, Moulton JR (1989) Experimental transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by *Hyalomma truncatum* Koch. *Am J Trop Med Hyg* 40: 207-212.
141. Gonzalez JP, Camicas JL, Cornet JP, Wilson ML (1998) Biological and clinical responses of west African sheep to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus experimental infection. *Res Virol* 149: 445-455.
142. Swanepoel R, Leman PA, Burt FJ, Jardine J, Verwoerd DJ, et al. (1998) Experimental infection of ostriches with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Epidemiol Infect* 121: 427-432.
143. Fisher-Hoch SP, McCormick JB, Swanepoel R, Van Middlekoop A, Harvey S, et al. (1992) Risk of human infections with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in a South African rural community. *Am J Trop Med Hyg* 47: 337-345.
144. Ergonul O (2006) Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 6: 203-214.
145. Ergonul O (2008) Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 78: 125-131.
146. Burt FJ, Paweska JT, Swanepoel R (2007) Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in South Africa. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever – A Global Perspective*: Springer. pp. 328.
147. Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, Leman PA, Mynhardt JH, et al. (1989) The clinical pathology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 4: S794-800.
148. Swanepoel R, Shepherd AJ, Leman PA, Shepherd SP, McGillivray GM, et al. (1987) Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa. *Am J Trop Med Hyg* 36: 120-132.
149. Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST (2006) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol* 80: 8834-8842.
150. Mild M, Simon M, Albert J, Mirazimi A (2010) Towards an understanding of the migration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol* 91: 199-207.
151. Tasdelen Fisgin N, Ergonul O, Doganci L, Tulek N (2009) The role of ribavirin in the therapy of Crimean-Congo hemorrhagic fever: early use is promising. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28: 929-933.
152. Zeller H (2007) Laboratory Diagnosis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever – A Global Perspective*: Springer. pp. 328.
153. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA (1989) Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 4: S801-806.
154. Burt FJ, Leman PA, Abbott JC, Swanepoel R (1994) Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiol Infect* 113: 551-562.
155. WHO (2008) Rift Valley fever fact sheet. *Wkly Epidemiol Rec* 83: 17-22.
156. Bird BH, Ksiazek TG, Nichol ST, Maclachlan NJ (2009) Rift Valley fever virus. *J Am Vet Med Assoc* 234: 883-893.
157. Sall AA, Zanutto PM, Sene OK, Zeller HG, Digoutte JP, et al. (1999) Genetic reassortment of Rift Valley fever virus in nature. *J Virol* 73: 8196-8200.
158. CDC (2000) Outbreak of Rift Valley fever–Saudi Arabia, August-October, 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 49: 905-908.

159. CDC (2000) Outbreak of Rift Valley fever–Yemen, August–October 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 49: 1065-1066.
160. Papa A, Konstantinou G, Pavlidou V, Antoniadis A (2006) Sandfly fever virus outbreak in Cyprus. *Clin Microbiol Infect* 12: 192-194.
161. Tesh RB, Saidi S, Gajdamovic SJ, Rodhain F, Vesenjok-Hirjan J (1976) Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bull World Health Organ* 54: 663-674.
162. Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, Nicoletti L, Papa A, et al. (2005) Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis* 11: 1657-1663.
163. Cross ER, Hyams KC (1996) The potential effect of global warming on the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. *Environ Health Perspect* 104: 724-727.
164. Naucke TJ, Menn B, Massberg D, Lorentz S (2008) Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res* 103 Suppl 1: S65-68.
165. Ciufolini MG, Maroli M, Guandalini E, Marchi A, Verani P (1989) Experimental studies on the maintenance of Toscana and Arbia viruses (Bunyaviridae: Phlebovirus). *Am J Trop Med Hyg* 40: 669-675.
166. Dionisio D, Esperti F, Vivarelli A, Valassina M (2003) Epidemiological, clinical and laboratory aspects of sandfly fever. *Curr Opin Infect Dis* 16: 383-388.
167. Konstantinou GN, Papa A, Antoniadis A (2007) Sandfly-fever outbreak in Cyprus: are phleboviruses still a health problem? *Travel Med Infect Dis* 5: 239-242.
168. Bartelloni PJ, Tesh RB (1976) Clinical and serologic responses of volunteers infected with phlebotomus fever virus (Sicilian type). *Am J Trop Med Hyg* 25: 456-462.
169. Nicoletti L, Verani P, Caciolli S, Ciufolini MG, Renzi A, et al. (1991) Central nervous system involvement during infection by *Phlebovirus toscana* of residents in natural foci in central Italy (1977-1988). *Am J Trop Med Hyg* 45: 429-434.
170. Dionisio D, Valassina M, Ciufolini MG, Vivarelli A, Esperti F, et al. (2001) Encephalitis without meningitis due to sandfly fever virus serotype toscana. *Clin Infect Dis* 32: 1241-1243.
171. Braitto A, Corbisiero R, Corradini S, Marchi B, Sancasciani N, et al. (1997) Evidence of Toscana virus infections without central nervous system involvement: a serological study. *Eur J Epidemiol* 13: 761-764.
172. Eitrem R, Stylianou M, Niklasson B (1991) High prevalence rates of antibody to three sandfly fever viruses (Sicilian, Naples, and Toscana) among Cypriots. *Epidemiol Infect* 107: 685-691.
173. Schwarz TF, Jager G, Gilch S, Pauli C, Eisenhut M, et al. (1996) Travel-related vector-borne virus infections in Germany. *Arch Virol Suppl* 11: 57-65.
174. Liu DY, Tesh RB, Travassos Da Rosa AP, Peters CJ, Yang Z, et al. (2003) Phylogenetic relationships among members of the genus *Phlebovirus* (Bunyaviridae) based on partial M segment sequence analyses. *J Gen Virol* 84: 465-473.
175. Eitrem R, Vene S, Niklasson B (1991) ELISA for detection of IgM and IgG antibodies to sandfly fever Sicilian virus. *Res Virol* 142: 387-394.
176. Magurano F, Nicoletti L (1999) Humoral response in Toscana virus acute neurologic disease investigated by viral-protein-specific immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 55-60.
177. Echevarria JM, de Ory F, Guisasola ME, Sanchez-Seco MP, Tenorio A, et al. (2003) Acute meningitis due to Toscana virus infection among patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *J Clin Virol* 26: 79-84.
178. Schwarz TF, Gilch S, Pauli C, Jager G (1996) Immunoblot detection of antibodies to Toscana virus. *J Med Virol* 49: 83-86.
179. Soldateschi D, dal Maso GM, Valassina M, Santini L, Bianchi S, et al. (1999) Laboratory diagnosis of Toscana virus infection by enzyme immunoassay with recombinant viral nucleoprotein. *J Clin Microbiol* 37: 649-652.
180. Schwarz TF, Gilch S, Schatzl HM (1998) A recombinant Toscana virus nucleoprotein in a diagnostic immunoblot test system. *Res Virol* 149: 413-418.

181. Tauber E, Kollaritsch H, Korinek M, Rendi-Wagner P, Jilma B, et al. (2007) Safety and immunogenicity of a Vero-cell-derived, inactivated Japanese encephalitis vaccine: a non-inferiority, phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 370: 1847-1853.
182. Tauber E, Kollaritsch H, von Sonnenburg F, Lademann M, Jilma B, et al. (2008) Randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial of the safety and tolerability of IC51, an inactivated Japanese encephalitis vaccine. *J Infect Dis* 198: 493-499.
183. Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, et al. (2000) Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol* 38: 1823-1826.
184. Cardoso MJ, Wang SM, Sum MS, Tio PH (2002) Antibodies against prM protein distinguish between previous infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *BMC Microbiol* 2: 9.
185. Pandey B, Yamamoto A, Morita K, Kurosawa Y, Rai S, et al. (2003) Serodiagnosis of Japanese encephalitis among Nepalese patients by the particle agglutination assay. *Epidemiol Infect* 131: 881-885.
186. Thakare JP, Gore MM, Risbud AR, Banerjee K, Ghosh SN (1991) Detection of virus specific IgG subclasses in Japanese encephalitis patients. *Indian J Med Res* 93: 271-276.
187. Sukhavachana P, Yuill TM, Russell PK (1969) Assay of arbovirus neutralizing antibody by micro methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 63: 446-455.
188. Wilson E (1927) Probable Inference, the Law of Succession and Statistical Inference. *J Am Stat Assoc* 22: 209-212.
189. van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, et al. (1992) Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 58: 2606-2615.
190. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
191. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
192. Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9: 299-306.
193. Behr JP (1994) Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug Chem* 5: 382-389.
194. Compton SJ, Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151: 369-374.
195. Cuzzubbo AJ, Endy TP, Vaughn DW, Solomon T, Nisalak A, et al. (1999) Evaluation of a new commercially available immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Japanese encephalitis infections. *J Clin Microbiol* 37: 3738-3741.
196. Jacobson JA, Hills SL, Winkler JL, Mammen M, Thaisomboonsuk B, et al. (2007) Evaluation of three immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Japanese encephalitis. *Am J Trop Med Hyg* 77: 164-168.
197. Schuh AJ, Li L, Tesh RB, Innis BL, Barrett AD (2010) Genetic characterization of early isolates of Japanese encephalitis virus: genotype II has been circulating since at least 1951. *J Gen Virol* 91: 95-102.
198. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, et al. (1989) An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 40: 418-427.
199. Rico-Hesse R (1990) Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174: 479-493.
200. Domingo C, Palacios G, Jabado O, Reyes N, Niedrig M, et al. (2006) Use of a short fragment of the C-terminal E gene for detection and characterization of two new lineages of dengue virus 1 in India. *J Clin Microbiol* 44: 1519-1529.

201. Xu F, Chen H, Travassos da Rosa AP, Tesh RB, Xiao SY (2007) Phylogenetic relationships among sandfly fever group viruses (Phlebovirus: Bunyaviridae) based on the small genome segment. *J Gen Virol* 88: 2312-2319.
202. Bird BH, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST (2007) Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. *J Virol* 81: 2805-2816.
203. Gammie AJ (2008) For the proposition: for the diagnosis of viral infections, commercial assays provide more reliable results than do in-house assays. *Rev Med Virol* 18: 73-76.
204. Powers DM, Greenberg N (1999) Development and use of analytical quality specifications in the in vitro diagnostics medical device industry. *Scand J Clin Lab Invest* 59: 539-543.
205. Elliott RM (2009) Bunyaviruses and climate change. *Clin Microbiol Infect* 15: 510-517.
206. Semenza JC, Menne B (2009) Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infect Dis* 9: 365-375.
207. Petersen LR, Busch MP (2010) Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sang* 98: 495-503.
208. La Ruche G, Souares Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, et al. (2010) First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill* 15.
209. Robert Koch-Institut (2010) Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009. Berlin.
210. Glick SM (1973) Loss of antigen-antibody affinity with storage of antiserum at-20c. *J Clin Endocrinol Metab* 37: 461-462.
211. Kurkela S, Helve T, Vaheri A, Vapalahti O (2008) Arthritis and arthralgia three years after Sindbis virus infection: clinical follow-up of a cohort of 49 patients. *Scand J Infect Dis* 40: 167-173.
212. Kurkela S, Manni T, Vaheri A, Vapalahti O (2004) Causative agent of Pogosta disease isolated from blood and skin lesions. *Emerg Infect Dis* 10: 889-894.
213. Jost H, Bialonski A, Storch V, Gunther S, Becker N, et al. Isolation and phylogenetic analysis of Sindbis viruses from mosquitoes in Germany. *J Clin Microbiol* 48: 1900-1903.
214. Nicoletti L, Ciccozzi M, Marchi A, Fiorentini C, Martucci P, et al. (2008) Chikungunya and dengue viruses in travelers. *Emerg Infect Dis* 14: 177-178.
215. Levett PN, Sonnenberg K, Sidaway F, Shead S, Niedrig M, et al. (2005) Use of immunoglobulin G avidity assays for differentiation of primary from previous infections with West Nile virus. *J Clin Microbiol* 43: 5873-5875.
216. Storch GA (2001) Diagnostic virology In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp. 566-604.
217. Schuller E, Klade CS, Wolf G, Kaltenbock A, Dewasthaly S, et al. (2009) Comparison of a single, high-dose vaccination regimen to the standard regimen for the investigational Japanese encephalitis vaccine, IC51: a randomized, observer-blind, controlled Phase 3 study. *Vaccine* 27: 2188-2193.
218. Veit O, Niedrig M, Chapuis-Taillard C, Cavassini M, Mossdorf E, et al. (2009) Immunogenicity and safety of yellow fever vaccination for 102 HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 48: 659-666.
219. Puthanakit T, Aurbul L, Yoksan S, Sirisanthana T, Sirisanthana V (2007) Japanese encephalitis vaccination in HIV-infected children with immune recovery after highly active antiretroviral therapy. *Vaccine* 25: 8257-8261.
220. Weinberger B, Keller M, Fischer KH, Stiasny K, Neuner C, et al. (2010) Decreased antibody titers and booster responses in tick-borne encephalitis vaccinees aged 50-90 years. *Vaccine* 28: 3511-3515.
221. Lang PO, Govind S, Mitchell WA, Siegrist CA, Aspinall R (2010) Vaccine effectiveness in older individuals: What has been learned from the influenza-vaccine experience. *Ageing Res Rev*.

222. A AN, Panthuyosri N, Anantapreecha S, Chanama S, Sa-NGasang A, et al. (2008) Cross-reactive IgM responses in patients with dengue or Japanese encephalitis. *J Clin Virol* 42: 75-77.
223. Treib J, Haass A, Kiessig ST, Woessner R, Grauer MT, et al. (1996) Tick-borne encephalitis diagnosis in patients with inflammatory changes in the cerebrospinal fluid in a region with very low prevalence. *Infection* 24: 400-402.
224. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis* 4.
225. Nawa M, Yamada KI, Takasaki T, Akatsuka T, Kurane I (2000) Serotype-cross-reactive immunoglobulin M responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 774-777.
226. Chahar HS, Bharaj P, Dar L, Guleria R, Kabra SK, et al. (2009) Co-infections with chikungunya virus and dengue virus in Delhi, India. *Emerg Infect Dis* 15: 1077-1080.
227. Bharaj P, Chahar HS, Pandey A, Diddi K, Dar L, et al. (2008) Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. *Virology* 5: 1.
228. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Su CL, Chien LJ, et al. (2004) Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 42: 2489-2494.
229. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R (1998) Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188: 1679-1689.
230. Warnatz K, Denz A, Drager R, Braun M, Groth C, et al. (2002) Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 99: 1544-1551.
231. Tangye SG, Good KL (2007) Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells? *J Immunol* 179: 13-19.
232. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Megret J, et al. (2009) Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 10: 1292-1299.
233. Guy B, Almond JW (2008) Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenges. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31: 239-252.
234. Gabriel M, Resch C, Gunther S, Schmidt-Chanasit J (2010) Toscana virus infection imported from Elba into Switzerland. *Emerg Infect Dis* 16: 1034-1036.
235. Tesh RB, Peters CJ, Meegan JM (1982) Studies on the antigenic relationship among phleboviruses. *Am J Trop Med Hyg* 31: 149-155.
236. Terrosi C, Olivieri R, Bianco C, Cellesi C, Cusi MG (2009) Age-dependent seroprevalence of Toscana virus in central Italy and correlation with the clinical profile. *Clin Vaccine Immunol* 16: 1251-1252.
237. Valassina M, Valentini M, Pugliese A, Valensin PE, Cusi MG (2003) Serological survey of Toscana virus infections in a high-risk population in Italy. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 483-484.
238. Tabachnick WJ Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistemics in a changing world. *J Exp Biol* 213: 946-954.
239. Arzt J, White WR, Thomsen BV, Brown CC Agricultural diseases on the move early in the third millennium. *Vet Pathol* 47: 15-27.
240. Burt FJ, Swanepoel R, Braack LE (1993) Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibody to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the sera of livestock and wild vertebrates. *Epidemiol Infect* 111: 547-557.
241. Johnson BK, Ocheng D, Gichogo A, Okiro M, Libondo D, et al. (1983) Antibodies against haemorrhagic fever viruses in Kenya populations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 731-733.

242. Swanepoel R, Struthers JK, McGillivray GM (1983) Reversed passive hemagglutination and inhibition with Rift Valley fever and Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses. *Am J Trop Med Hyg* 32: 610-617.
243. Qing T, Saijo M, Lei H, Niikura M, Maeda A, et al. (2003) Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. *J Virol Methods* 108: 111-116.
244. Yashina L, Petrova I, Seregin S, Vyshemirskii O, Lvov D, et al. (2003) Genetic variability of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Russia and Central Asia. *J Gen Virol* 84: 1199-1206.
245. Shah K, Nathanson N (1976) Human exposure to SV40: review and comment. *Am J Epidemiol* 103: 1-12.
246. Poulin DL, DeCaprio JA (2006) Is there a role for SV40 in human cancer? *J Clin Oncol* 24: 4356-4365.
247. Gerber P (1967) Patterns of antibodies to SV40 in children following the last booster with inactivated poliomyelitis vaccines. *Proc Soc Exp Biol Med* 125: 1284-1287.
248. Shah KV, Weismann M, Murphy GP (1972) Occurrence of simian virus 40 (SV40)-reacting antibodies in sera of some patients with prostatic cancer. *J Surg Oncol* 4: 89-93.
249. Shah KV, Palma LD, Murphy GP (1971) The occurrence of SV40-Neutralizing antibodies in sera of patients with genitourinary carcinoma. *J Surg Oncol* 3: 443-450.
250. Niedrig M, Avsic T, Aberle SW, Ferenczi E, Labuda M, et al. (2007) Quality control assessment for the serological diagnosis of tick borne encephalitis virus infections. *J Clin Virol* 38: 260-264.
251. Niedrig M, Zeller H, Schuffenecker I, Drosten C, Emmerich P, et al. (2009) International diagnostic accuracy study for the serological detection of chikungunya virus infection. *Clin Microbiol Infect* 15: 880-884.
252. Calisher CH, Nuti M, Lazuick JS, Ferrari JD, Kappus KD (1981) Dengue in the Seychelles. *Bull World Health Organ* 59: 619-622.
253. Dussart P, Lavergne A, Lagathu G, Lacoste V, Martial J, et al. (2006) Reemergence of dengue virus type 4, French Antilles and French Guiana, 2004-2005. *Emerg Infect Dis* 12: 1748-1751.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Alanin
ADE	<i>antibody dependent enhancement</i>
<i>A. dest</i>	Destilliertes Wasser
<i>A. aegyptii</i>	<i>Aedes aegyptii</i>
<i>A. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua mol.</i>	Wasser, molekularbiologischer Reinheit
BSL	<i>Biological safety Level</i> / biologischen Sicherheitsstufe
CCHF	<i>Creean Congo Hemorrhagic Fever</i> / Krim-Kongo hämorrhagisches Fieber
CCHFV	<i>Creean Congo Hemorrhagic Fever Virus</i> / Krim-Kongo hämorrhagische Fieber-Virus
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CE	<i>Conformité Européenne</i>
CHIK	Chikungunya
CHIKV	Chikungunya-Virus
CYPV	Sandfliegen-Fieber Cyprus-Virus
DEN	Dengue
DENV	Dengue-Virus
DF	Dengue-Fieber
DHF	Dengue Hämorrhagische Fieber
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DMEM	Dulbecco 's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSS	Dengue Schock Syndrom
DTT	Dithiothreolin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EN	Europäische Norm
E-Protein	<i>Envelope</i> -Protein
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
G	Genotyp
GPC	<i>Glycoprotein precursor</i>
G-Protein	<i>Glyco</i> -Protein
h	Stunde
HIA	<i>Haemagglutination Inhibition Assay</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> / Meerrettich-Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ISR	Immunstatus Ratio
JE	Japanische Encephalitis
JEV	Japanisches Encephalitis-Virus

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

kbp	<i>Kilo base pairs</i>
kDa	Kilo Dalton
L-Segment	<i>Large-Segment</i>
M	molar
mAK	Monoklonaler Antikörper
MEM	Modified Eagles Medium
MEPP	Mercaptoethanol-Probenpuffer
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
M-Protein	<i>Membrane-Protein</i>
M-Segment	<i>Medium-Segment</i>
N	normal
NCA	<i>normal cell antigen</i>
NCBI	<i>National Centers for Biotechnology Information</i>
nd	nicht durchgeführt
neg	negativ
NS-Protein	<i>Non structural-Protein</i>
NT	Neutralisationstest
OD	Optische Dichte
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
PFU	<i>Plaque forming units</i> / Plaqueauslösenden Einheiten
pos	positiv
PP	Prozentsatz der Positivität
prM-Protein	<i>pre membrane-Protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
PRNT	Plaque-Reduktions-Neutralisationstest
PRNT50	50 % Plaque-Reduktions-Neutralisationstest
RT-PCR	<i>real time-PCR</i>
RVF	<i>Rift Valley Fever</i> / Riftalfieber
RVFV	<i>Rift Valley Fever Virus</i> / Riftalfieber-Virus
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> / Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis</i>
S-Segment	<i>Small-Segment</i>
SFNV	Sandfliegen-Fieber-Naples-Virus
SFSV	Sandfliegen-Fieber-Sicilian-Virus
SFV	Sandfliegen-Fieber-Virus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TOSV	Sandfliegen-Fieber Toscana-Virus
UV	ultraviolett
V	Tag nach Impfung
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Liste der Vorab-Publikationen dieser Dissertation und weitere publizierte Artikel

Verschiedene Teile dieser Dissertation wurden vorab, in Absprache mit Prof. Dr. Rupert Mutzel von der Freien Universität Berlin, publiziert.

Vorab-Publikationen der Dissertation:

Litzba, N., Schuffenecker, I., Zeller, H., Drosten, C., Emmerich, P., Charrel, R., Kreher, P. and Niedrig, M., 2008. Evaluation of the first commercial chikungunya virus indirect immunofluorescence test. *J Virol Methods* 149, 175-9.

Litzba, N., Klade, C.S., Lederer, S., Niedrig, M., 2010. Evaluation of serological diagnostic test systems assessing the immune response to Japanese encephalitis vaccination. Accepted by *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Weitere Publikationen:

Veit, O., Niedrig, M., Chapuis-Taillard, C., Cavassini, M., Mossdorf, E., Schmid, P., Bae, H.G., Litzba, N., Staub, T., Hatz, C. and Furrer, H., 2009. Immunogenicity and safety of yellow fever vaccination for 102 HIV-infected patients. *Clin Infect Dis* 48, 659-66.

Ergünay, K., Saygan, M.B., Aydogan, S., Litzba, N., Niedrig, M., Pınar, A., Dürdal, U., 2010. Dengue Virus and Yellow Fever Virus Exposure in Blood Donors from Central/Northern Anatolia, Turkey. *Mikrobiyol Bult* 44, 413-422.

Ergünay, K., Aydogan, S., Litzba, N., Sener, B., Lederer, S., Niedrig, M., Haşcelik, G., Us, D., 2010. Confirmed Exposure to Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) and Probable Human Cases of Tick-Borne Encephalitis (TBE) in Central/Northern Anatolia, Turkey. *Zoonoses and Public Health*. [Epub ahead of print]

Ergünay, K., Litzba, N., Lo, M.M., Aydogan, S., Saygan, M.B., Niedrig, M., Weidmann, M., 2010. Performance of Various Commercial Assays for the Detection of Toscana Virus (TOSV) Antibodies. Eingereicht bei *J Clin Virol*.

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich versichere, dass diese Arbeit in dieser oder anderer Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Berlin, 20. Oktober 2010

Nadine Litzba

11 Danksagung

Prof. Dr. Matthias Niedrig möchte ich herzlich danken für seine andauernde Unterstützung, das Vertrauen, das er mir entgegen gebracht und die vielen Möglichkeiten, die er mir im Laufe der Doktorarbeit gegeben hat. Vielen Dank!

Mein aufrichtiger Dank geht an Prof. Mutzel für seine sofortige Bereitschaft als Gutachter für diese Arbeit zu fungieren.

Winfried Stöcker möchte ich für die Finanzierung der Doktorarbeit danken und dafür, dass er mir auch weiterhin Vertrauen schenkt. Sabine, Kai und Karen, sowie viele weitere Mitarbeiter der EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG haben mir Unterstützung und Hilfe zu teil werden lassen. Dafür ein großes Dankeschön!

Ich möchte herzlich auch den vielen Kooperationspartnern danken ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und die mir zudem zum Teil die Möglichkeit gegeben haben bei ihnen zu arbeiten: Isabelle Schuffenecker und Hervé Zeller (Institut Pasteur, Lyon, Frankreich), Christian Drosten (Universitätsklinikum Bonn), Petra Emmerich (Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg), Remi Charrel (MCU-PH, Marseille, Frankreich), Christoph Klade (Intercell AG, Vienna, Österreich), Cristina Domingo-Carasco (Robert Koch-Institut, Berlin), Ramon Flick (BioProtection Systems Corporation, Iowa, USA), Tatjana Avšic-Županc und Ana Saksida (Universität Ljubljana, Slovenien), Gulay Korukluoglu, Yavuz Uyar und Ahmet Carhan (Refik Saydam National Hygiene Center, Ankara, Türkei), Sadesh Chinikar (Institut Pasteur, Teheran, Iran), Janusz Paweska (National Institute for Communicable Disease, Sandringham, Südafrika), Önder Ergönül (Marmara University, Istanbul, Türkei), Moujahed Kao (KAU, Jeddah, Saudi-Arabien) und Koray Ergünay (Hacettepe Universität, Ankara, Türkei).

Petra, Dir möchte ich für Deine große Hilfe bei den Inkubationen danken und für die schönen gemeinsamen Arbeitstage in Lyon und Ljubljana.

Ein großer Dank geht an Sonja da sie sich, trotz meiner kurzfristigen Frage, sofort bereit erklärt hat Teile meiner Doktorarbeit Korrektur zu lesen.

Danke an meine Mitstreiter auf dem langen und manchmal beschwerlichen Weg der Doktorarbeit. Ohne Euch hätte es nur halb soviel Spaß gemacht und ihr habt für eine unvergessliche Doktorandenzeit mit vielen lustigen und schönen Momenten gesorgt. Danke für Eure Freundschaft!

Katha (unsere liebenswerte Chaotin - merci!), Matze (nun geht unsere gemeinsame Arbeitszeit leider doch zu Ende - ich wünsche Dir alles Gute für Deinen Aufbruch zu neuen Ufern in Grenzach!), Nina (mit Deinen verrückten Ideen hast Du unser beschauliches Doktorandendasein schön aufgewirbelt :o)), René (ich wünschte ich könnte mir nur halb so gut Zitate merken wie Du ;o)), Peter (Mr. Marathon) und Yesica.

Pranav und Robby, meine beiden unvergleichlichen Diplomanden: Es hat Spaß gemacht mit Euch zusammen zu arbeiten und ich wünsche Euch für die Zukunft alles erdenklich Gute.

Vielen Dank auch an meine Praktikantinnen Julia, und besonders Katja und Juliane.

Ich möchte der ganzen Arbeitsgruppe für die schöne Atmosphäre danken, die das Arbeiten immer sehr angenehm gemacht hat: Anette, Camille, Cristina, Chao, Doreen, Dia, Marion, Hewad, Julia, Kretschi, Leonid, Oli, Patricia, Petra Baer und Regina, sowie Deli und Frau Sim. Ihr seid einmalig!

Und dann natürlich all den anderen, die einen Teil des Arbeitsweges mit mir gegangen sind, und all den lieben Menschen aus anderen Abteilungen, die ich im RKI kennengelernt habe.

Ein großes Dankeschön geht an Marcel und Hi-Gung, ohne die ich nie (zweimal) den Weg ins RKI gefunden hätte und die somit mein Leben entscheidend geprägt haben. Es war unvergesslich mit Euch zusammenzuarbeiten, ich habe viel von Euch gelernt und eine Menge Spaß gehabt.

Eine große Umarmung geht an meine Familie. Ohne Eure Unterstützung in all den Jahren, wäre ich nicht da wo ich jetzt bin. Wenn ihr auch alle weit weg seid, ein Teil von Euch ist immer auch bei mir.

Eine weitere Umarmung geht an meine Freunde - für Eure Geduld und Unterstützung, dafür, dass ihr mir einen Ausgleich zu der wissenschaftlichen Welt gebt – und einfach dafür, dass ihr da seid.

Dir, Axel gehört mein besonderer Dank, dafür dass Du mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt hast. Du hast Recht – wichtig ist letztendlich, dass wir immer füreinander da sind. Komme was wolle!